

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
N° D.U : 1690

UNIVERSITE AUVERGNE  
Année 2006

*Ecole Doctorale*  
*Des Sciences de la Vie et de la Santé*  
N° d'ordre : 448

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue le 10 Novembre 2006

**Laurent LEOTOING**

\*\*\*\*\*

La nucléophosmine, un nouveau partenaire du récepteur des androgènes.  
Implication dans le cancer de la prostate.

\*\*\*\*\*

Président : Pr. Jean-Marc LOBACCARO  
Rapporteurs : Pr. Frank CLAESSENS  
Pr. Sophie PISON-ROUSSEAU  
Dr. Didier TROUCHE  
Directeur de thèse : Dr. Claude BEAUDOIN

Laboratoire de Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire  
UMR CNRS-UBP 6547



UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
N° D.U : 1690

UNIVERSITE AUVERGNE  
Année 2006

*Ecole Doctorale*  
*Des Sciences de la Vie et de la Santé*  
N° d'ordre : 448

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue le 10 Novembre 2006

**Laurent LEOTOING**

\*\*\*\*\*

La nucléophosmine, un nouveau partenaire du récepteur des androgènes.  
Implication dans le cancer de la prostate.

\*\*\*\*\*

Président : Pr. Jean-Marc LOBACCARO  
Rapporteurs : Pr. Frank CLAESSENS  
Pr. Sophie PISON-ROUSSEAU  
Dr. Didier TROUCHE  
Directeur de thèse : Dr. Claude BEAUDOIN

Laboratoire de Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire  
UMR CNRS-UBP 6547









Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Georges VEYSSIERE de m'avoir accueilli dans son laboratoire, me donnant ainsi la chance de réaliser ce travail.

Je remercie le Professeur Frank CLAESSENS, le Professeur Sophie PISON-ROUSSEAUX et le Docteur Didier TROUCHE d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit.

Merci au Professeur Jean-Marc LOBACCARO de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

Claude, comment résumer en quelques lignes ces cinq dernières années... Vous m'avez tout d'abord fait confiance quand vous m'avez confié le sujet de master. Durant cette période, vous avez pleinement joué votre rôle de mère poule. Par la suite, vous m'avez laissé prendre une certaine indépendance pour conduire à bien le projet de thèse. C'est alors que vous avez dû faire face à mon « optimisme légendaire », et sans cesse tenter de me repêcher face au doute et découragement (en témoigne le magnifique cadre plastic en relief représentant une bouée de sauvetage et des nœuds marins, que vous m'avez offert). Notre bureau, dans lequel nous avons cohabité quotidiennement, a été le lieu d'intenses séances de travail, de discussions en tous genre, de moments de détente. Aussi, je vous remercie pour ces cinq années de présence dans le cadre du travail, mais aussi pour l'amitié que nous avons entretenue en dehors du laboratoire.

Une pensée toute particulière pour Michèle MANIN, qui a assumé la co-direction de mon master et de ma thèse durant ces cinq années. Au-delà de cette fonction, je tiens à vous témoigner, Michèle, ma profonde reconnaissance pour votre implication sans limite dans mon projet et votre présence quotidienne. En effet, vous avez su vous rendre disponible à chacun de mes besoins, qu'ils soient d'ordre technique ou scientifique, et avez été sans cesse attentionnée à mon égard. Votre bonne humeur, votre optimisme et vos encouragements incessants m'ont permis de faire face aux fréquentes déceptions, aux longues périodes de doute, aux moments difficiles, me permettant ainsi de reprendre confiance, de relever la tête et aller de l'avant. J'éprouve aussi une grande admiration pour votre engagement vis-à-vis de la recherche, qui se traduit par la réalisation d'une charge conséquente de travail quotidien, une réactivité face aux impératifs et une joie sans cesse renouvelée par un nouveau résultat. Pour tout ceci, Michèle, je vous remercie.



Laurent, je souhaite souligner vos qualités de responsable d'équipe. En effet, la charge de vos responsabilités d'enseignement et de recherche n'entame en rien votre disponibilité. Il est toujours rassurant de pouvoir compter sur votre aide et sur vos conseils scientifiques. De plus, chaque jour, j'ai pu apprécier votre gentillesse, votre culture et vos qualités humaines. Je vous remercie pour tous les moments d'enrichissement que vous m'avez apportés.

Je remercie également tous les membres du laboratoire PCEM pour leur accueil et leur présence quotidienne.

Un immense merci à Jean-Paul SARU pour son aide technique de grande qualité, sa disponibilité, et sa bonne humeur communicative. Je remercie également Angélique DE HAZE et Dominique CHEYVIALLE pour leur soutien technique.

Une pensée pour tous les étudiants et post-doctorants du laboratoire que j'ai côtoyés durant ces cinq ans : Silvère, Sarah, Kévin, Antonine, Gérôme, Bruno, Delphine, Virginie, Corinne, David, Pierre, Claire, Céline, Aurélia.

Je remercie tous les gens avec lesquels nous avons collaboré : le Pr. M. BENAHMED, Léo MEUNIER, Dr. Claire MAUDUIT, Dr. Myriam DECAUSSIN *U407 INSERM LYON*, le Dr. F. PENNAULT-LLORCA, Anne CAIRE, Christiane JULLIEN, le Dr. Yves COMMUNAL *centre Jean Perrin Clermont Ferrand*, le Dr. Didier MONTE *UMR CNRS 6181 Lille*, Christophe CHAMBON *INRA St-genès-Champanelle*. Je remercie aussi Alain BRUHAT pour son aide précieuse, ses conseils techniques et ses discussions scientifiques.

Une pensée pour mes amis avec lesquels tout a commencé: Guillaume, Amena, Damien, Emilie, Francis, Alex, Fabien.



Ce manuscrit de thèse, s'il n'est pas une finalité, représente néanmoins l'aboutissement d'un certain nombre d'années d'études. Il me donne alors l'occasion de témoigner à mes parents ma profonde reconnaissance pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de cette période. Ils se sont en effet toujours montrés présents lorsque je connaissais le découragement, et leurs paroles rassurantes m'ont sans cesse incité à persévérer dans la voie que j'avais choisie. Pour ceci, et bien plus encore, chers parents, je vous remercie du fond du cœur.

J'associe bien évidemment à ces remerciements, toute ma famille et belle-famille.

Ma chère Nadia, il est si difficile de traduire simplement, l'importance de ton soutien tout au long de ces cinq dernières années. C'est en effet ton réconfort et tes attentions quotidiennes, qui m'ont donné l'élan nécessaire pour avancer chaque jour un peu plus. Face à mon investissement pour le travail parfois très pesant, tu t'es toujours montrée compréhensive et confiante. Dans chacun de mes choix, tu m'as épaulé et conforté. Lors des moments difficiles, tu étais près de moi. Je souhaite ainsi t'assurer de ma reconnaissance infinie, et partager avec toi, le plaisir d'avoir réalisé ce travail.

*A Nadia, mon épouse.*





## ***Préambule***

Chez l'homme, les androgènes sont des hormones stéroïdes synthétisées à partir du cholestérol au niveau des testicules et des glandes surrénales et convertis au niveau de différents tissus périphériques en métabolite actif : la dihydrotestostérone. L'action de ces hormones est relayée au niveau de la cellule par le récepteur des androgènes (AR), un facteur de transcription inductible de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les androgènes sont largement impliqués dans la physiologie de nombreux organes. En effet, ils sont responsables du développement et de la maturation fonctionnelle de l'appareil génital mâle, sont impliqués dans la masculinisation du cerveau, possèdent des effets anabolisants sur les muscles ou participent encore au maintien de la structure osseuse.

Le mode classique d'activation du récepteur des androgènes passe par la fixation de son ligand, sa translocation nucléaire et l'activation de la transcription de gènes cibles. Son action est sans cesse épaulée et modulée par son interaction avec d'autres protéines. En effet, que ce soit dans le compartiment cytosolique ou nucléaire, le récepteur se trouve couplé à des partenaires que l'on appelle des co-régulateurs. Ces derniers sont essentiels aux propriétés fonctionnelles de AR telle que sa stabilité, son affinité pour le ligand, sa translocation nucléaire, son affinité pour l'ADN ou encore sa capacité à recruter la machinerie transcriptionnelle. De plus, par leur interaction transitoire, leur activité inductible ou encore leur tissu-spécificité, ils permettent une réponse adaptative et spécifique de la cellule ou de l'organe aux androgènes. Ainsi, les partenaires du récepteur des androgènes participent au contrôle de son activité pour moduler le signal hormonal et l'action physiologique des androgènes sur les cellules androgéno-sensibles.

Le récepteur des androgènes est l'acteur central de la signalisation androgénique puisqu'il est le médiateur qui établit la connexion fonctionnelle entre le signal hormonal et la réponse cellulaire. Ainsi, des anomalies de sa structure ou encore les dérégulations de son mode de fonctionnement sont associées à diverses pathologies telles que les insensibilités aux



androgènes, au syndrome de Kennedy ou encore au cancer de la prostate. Cette dernière, qui touche en France un homme sur sept, est une pathologie multifactorielle dont la croissance initiale est dépendante des androgènes. La compréhension des mécanismes responsables de la progression tumorale quasi-inéluctable vers une croissance androgéno-indépendante fait l'objet d'intenses investigations. Plusieurs mécanismes induisant une activation aberrante du récepteur des androgènes ont été mis en évidence : on note des mutations de la protéine, une dérégulation des équilibres protéiques des co-facteurs du récepteur ou encore son activation par des voies de signalisation cellulaires telles que celles initiées par les facteurs de croissance.

La recherche bibliographique présentée dans ce manuscrit décrit le mode d'action et le rôle des androgènes dans la physiologie cellulaire, les différents niveaux de régulation de son activité notamment par son interaction avec un nombre important de protéines co-régulatrices. Ces données témoignent de la complexité des mécanismes mis en jeu pour déterminer les équilibres subtils de régulation de la physiologie endocrinienne. et l'implication des androgènes dans la physiopathologie.

La recherche expérimentale décrit l'identification d'un nouveau partenaire de AR et son rôle dans la régulation de l'activité du récepteur. En effet, dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement tumoral précoce, mon projet de thèse visait à identifier des partenaires de AR dont les profils d'expression et d'interaction étaient régulés de façon différentielle dans les états de prolifération et de différenciation. Parmi les protéines identifiées, la nucléophosmine/B23.1 a fait l'objet d'une étude approfondie pour définir son mode de régulation de l'activité de AR et son implication possible dans la pathologie tumorale prostatique.



\*\*\*\*\*

## *Abréviations*

\*\*\*\*\*



<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
<b>17<math>\beta</math>-HSD</b>	17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
<b>ACTH</b>	adreno corticotropic hormone
<b>ACTR</b>	acetyltransferase
<b>AD</b>	activation domain
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>AES</b>	amino-terminal enhancer of split
<b>AF</b>	activating function
<b>AIB1</b>	amplified in breast cancer 1
<b>akr1b7</b>	aldoketoreductase b7
<b>ALK</b>	anaplastic lymphoma kinase
<b>AMH</b>	anti-müllerian hormone
<b>AML</b>	acute mielogenous leukemia
<b>AMPc</b>	adénosine monophosphate cyclique
<b>ANPK</b>	AR-interacting protein kinase
<b>APAF1</b>	apoptotic protease activating factor-1
<b>APP</b>	amyloid precursor protein
<b>AR</b>	androgen receptor
<b>ARA</b>	AR-associated protein
<b>ARE</b>	androgen response element
<b>ARF</b>	alternative reading frame
<b>ARIP4</b>	AR-interacting protein 4
<b>ARNIP</b>	AR N-terminal interacting protein
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger
<b>ARR19</b>	androgen receptor corepressor 19kDa
<b>ART-27</b>	AR trapped clone 27
<b>ATF2</b>	activation transcription factor 2
<b>ATP</b>	adenosine triphosphate
<b>B2M</b>	$\beta$ -2-microglobuline
<b>BAF57</b>	BRG1 associated factor 57
<b>BAFs</b>	BRM/BRG1 associated factors
<b>BAG-1L</b>	BAG-1 long
<b>Bcl-2</b>	B-cell leukemia/lymphoma 2
<b>Bcl-xL</b>	Bcl-2-like 1 protein long form
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor
<b>bHLH/PAS</b>	basic helix loop helix/ Per.ARNT.Sim
<b>BMP</b>	bone morphogenetic proteins
<b>BPH</b>	benign prostatic hyperplasia
<b>BRCA1</b>	breast cancer susceptibility gene 1
<b>BRE</b>	TFIIB-response element
<b>BRG1</b>	brahma-related gene 1
<b>BRM</b>	brahma
<b>BSA</b>	bovine serum albumine
<b>CAIS</b>	complete androgen insensitivity syndrome
<b>CAK</b>	CDK activating kinase
<b>CARM1</b>	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
<b>CBP/p300</b>	CREB-binding protein/p300
<b>cdc2</b>	cell division control 2
<b>CDK</b>	cyclin dependant kinase
<b>CHIP</b>	carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein





<b>Cip</b>	cyclin inhibitory protein
<b>CK2</b>	casein kinase 2
<b>CKI</b>	cyclin dependant kinase inhibitor
<b>COUP-TF</b>	chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
<b>CPA</b>	cypoterone acetate
<b>c-Ras</b>	cellular murine sarcoma virus oncogene homolog
<b>Cre</b>	cellular recombinase
<b>CREB</b>	cAMP response element binding protein
<b>Cre-ERt</b>	cellular recombinase fused to mutated estrogen receptor LBD
<b>CYP7A1</b>	cholesterol 7 alpha hydroxylase
<b>DAG</b>	diacylglycerol
<b>DAX1</b>	dosage-sensitive adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1
<b>Daxx</b>	death domain associated protein
<b>DBD</b>	DNA binding domain
<b>DHEA</b>	déhydroépiandrosterone
<b>DHT</b>	dihydrotestosterone
<b>DR</b>	direct repeat
<b>E1</b>	oestrone
<b>E2</b>	17 $\beta$ -oestradiol
<b>E6-AP</b>	E6-associated protein
<b>EBL+</b>	ERE- $\beta$ -2-microglobuline luciferase
<b>EGF</b>	epidermal growth factor
<b>EGF-R</b>	EGF receptor
<b>ER</b>	estrogen receptor
<b>ERE</b>	estrogen response element
<b>ERM</b>	ets family member
<b>FADD</b>	fas associated death domain
<b>FGF</b>	fibroblastic growth factor
<b>FHL2</b>	four and a half LIM-only protein 2
<b>FKBP52</b>	FK506 binding protein 52kDa
<b>FKHRL1</b>	forhead in rhabdomyosarcoma L1
<b>FRET</b>	fluorescence resonance energy transfer
<b>FSH</b>	follicle-stimulating hormone
<b>FXR</b>	farnesoid X receptor
<b>G9a</b>	histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
<b>GnRH</b>	gonadotropin-releasing hormone
<b>GPCR</b>	G protein-coupled receptor
<b>GR</b>	glucocorticoid receptor
<b>GRIP1</b>	glucocorticoid receptor-interacting protein 1
<b>GST</b>	glutathion S-transférase
<b>GTF</b>	general transcription factor
<b>HAT</b>	histone acetyltransferase
<b>HBO1</b>	histone acetyltransferase binding to the origin recognition complex 1
<b>HDAC</b>	histone deacetylase
<b>HG</b>	high grade
<b>Hip</b>	hsc70 interacting protein
<b>HMG</b>	high mobility group
<b>HSP</b>	heat shock protein



<b>IκB</b>	inhibitor κB
<b>IAPs</b>	cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins
<b>IGF1</b>	insuline-like growth factor I
<b>IGF-BP4</b>	IGF-binding protein 4
<b>IL1α et β</b>	interleukine 1α et β
<b>INHAT</b>	inhibitor of acetyltransferase
<b>INK4</b>	inhibitor of CDK4
<b>IP3</b>	inositol triphosphate
<b>IR</b>	inverted repeat
<b>IRF-1</b>	interferon regulatory factor-1
<b>JAKs</b>	janus kinases
<b>Kb</b>	kilobase
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>KGF</b>	keratinocyte growth factor
<b>Kip</b>	kinase inhibitory protein
<b>LBD</b>	ligand binding domain
<b>LDL</b>	low density lipoprotein
<b>LG</b>	low grade
<b>LH</b>	luteinizing hormone
<b>LHRH</b>	luteinizing hormone releasing hormone
<b>LXR</b>	liver X receptor
<b>MAIS</b>	midle androgen insensivity syndrome
<b>MALDI-TOF</b>	source MALDI-Time of flight
<b>MAPKinase</b>	mitogen activated kinase
<b>MDS</b>	myelodisplastic syndrome
<b>MLF1</b>	myelodisplasia/myeloid leukaemia factor 1
<b>MMTV</b>	mouse mammary tumor virus
<b>MR</b>	mineralocorticoid receptor
<b>mSin3A</b>	mammalian switch-independent 3 protein
<b>mvdp</b>	mouse vas deferens protein
<b>NcoA</b>	nuclear receptor coactivator
<b>N-CoR</b>	nuclear receptor corepressor
<b>NF-κB</b>	nuclear factor κB
<b>NIL</b>	neuronal intranuclear inclusion
<b>NKX3-1</b>	NK3 transcription factor locus 1
<b>NLS</b>	nuclear localization signal
<b>nM</b>	nano molar
<b>NPM</b>	nucleophosmin
<b>NRs</b>	nuclear receptors
<b>OCT1/2</b>	octamer transcription factors 1/2
<b>P450 aro</b>	cytochrome P450 aromatase
<b>P450c17</b>	cytochrome P450 17α-hydroxylase 17/20, lyase
<b>P450scc</b>	P450 side chain cleavage
<b>PAIS</b>	partial androgen insensivity syndrome
<b>PAK6</b>	p21-activated kinase 6
<b>PAT1</b>	protein interacting with APP tail 1
<b>pCAF</b>	p300/CBP associated factor
<b>pCIP</b>	p300/CBP cointegrator-associated protein
<b>PDEF</b>	prostate derived Ets factor
<b>PI3Kinase</b>	phospoinositid-3-OH kinase



<b>PIAS</b>	protein inhibitor of activated STA3
<b>PIC</b>	preinitiation complex
<b>PIN</b>	prostatic intra-epithelial neoplasia
<b>PLC</b>	phospholipase C
<b>Plk1</b>	Polo-like kinase 1
<b>PMA</b>	phorbol 12-myristate 13-acétate
<b>PPARs</b>	peroxisome proliferator-activated receptors
<b>PR</b>	progesterone receptor
<b>PRMT1</b>	protein arginine N-methyltransferase
<b>PSA</b>	prostate specific antigen
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
<b>PXR</b>	pregnane X receptor
<b>RAC3</b>	receptor associated coactivator 3
<b>RanBPM</b>	Ran binding protein in microtubule organising centre
<b>RAR</b>	retinoic acid receptor
<b>Rb</b>	retinoblastoma protein
<b>RD</b>	repression domains
<b>RID</b>	receptor interacting domains
<b>RIP140</b>	receptor interacting protein 140 kDa
<b>RNA POL II</b>	ARN polymerase II
<b>RTS</b>	Rubinstein-Taybi syndrome
<b>RXR</b>	retinoic X receptor
<b>SBMA</b>	spinal and bulbar muscular atrophy
<b>S-DHEA</b>	DHEA- sulphate
<b>SF1</b>	steroidogenic factor 1
<b>sh</b>	short hairpin
<b>SHBG</b>	sex hormone binding globulin
<b>SHP</b>	short heterodimer partner
<b>Smad</b>	human Sma and Mad homolog
<b>SMRT</b>	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
<b>SNURF</b>	small nuclear RING finger protein
<b>SOX9</b>	sex determining region Y, box 9
<b>SP1</b>	specific protein 1
<b>SRC</b>	steroid receptor co-activator
<b>SRY</b>	sex determining region Y
<b>StAR</b>	steroidogenic acute regulatory protein
<b>STAT</b>	signal transducer and activator of transcription
<b>SWI/SNF</b>	switch/sucrose nonfermenting
<b>T3</b>	triiodothyronine
<b>T4</b>	tétraiodothyronine ou thyroxine
<b>TAF-1</b>	template activating factor 1
<b>TAFIIIs</b>	TBP associated factors
<b>TBP</b>	TATA Binding Protein
<b>TeBG</b>	testosterone binding-globulin
<b>TF</b>	transcription factor
<b>TFII</b>	transcription factor II
<b>Tfm</b>	testicular feminized
<b>TGF<math>\alpha</math> et <math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\alpha$ et $\beta$
<b>TGIF</b>	5'TG3' interacting factor
<b>TIF-2</b>	transcription intermediary factor 2



<b>Tip60</b>	Tat-interactive protein 60 kDa
<b>TPR</b>	tetratricopeptide repeat
<b>TR4</b>	testicular orphan receptor 4
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis inducing ligand
<b>TRAIL-R</b>	TNF-related apoptosis inducing ligand receptor
<b>TRAM1</b>	thyroid hormone receptor activator molecule 1
<b>TRAP 220</b>	human thyroid hormone receptor-associated protein
<b>TSA</b>	trichostatin A
<b>Ubc9</b>	ubiquitin-conjugated enzyme homologue
<b>UGE</b>	urogenital epithelium
<b>UGM</b>	urogenital mesenchyme
<b>v-akt</b>	murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog/PKB
<b>VDEC</b>	vas deferens epithelial cells
<b>VDR</b>	vitamin D receptor
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>WT1</b>	wilm's tumour 1
<b>Ydj1</b>	yeast DNAJ 1
<b>YY1</b>	yin yang 1





\*\*\*\*\*

# *Sommaire*

\*\*\*\*\*



**Bibliographie.....5**

**I. Les androgènes : physiologie et modes d'action. ....6**

A.	Les androgènes.....	6
1.	Les androgènes : hormones stéroïdes.....	6
2.	Bio-synthèse des androgènes. ....	7
3.	Contrôle de la production des androgènes par l'axe hypothalamo-hypophysaire. ...	8
4.	Effets physiologiques des androgènes.....	9
a.	Développement et maintien du tractus génital mâle. ....	10
b.	Les androgènes et la physiologie musculaire.....	12
c.	Les androgènes et la physiologie osseuse. ....	13
B.	Le récepteur des androgènes appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires..	14
1.	La superfamille des récepteurs nucléaires (NRs).....	14
a.	Généralités.....	14
b.	Les différentes classes de récepteurs nucléaires. ....	15
2.	Structure du récepteur des androgènes.....	17
a.	Domaine transactivateur amino-terminal A/B. ....	17
b.	Domaine C de liaison à l'ADN. ....	18
c.	Région charnière D.....	18
d.	Domaine de liaison du ligand E/F.....	19
C.	Modes d'action des androgènes. ....	19
1.	Mode d'action génomique du récepteur des androgènes. ....	19
a.	Fonctionnement général. ....	19
b.	Les anti-androgènes.....	21
2.	Mode d'action non-génomique. ....	22

**II. Modulation de l'activité du récepteur des androgènes par son interaction avec des protéines co-régulatrices. ....25**

A.	Interactions protéiques modulant la stabilité et la localisation du récepteur des androgènes.....	26
1.	Modulation de la stabilité et du niveau d'accumulation de AR par des protéines co-régulatrices. ....	26
2.	Modulation de la localisation de AR par des protéines co-régulatrices.....	29
a.	Protéines facilitant le transfert cytoplasme-noyau de AR.....	29



b.	Protéines inhibant le transfert cytoplasme-noyau de AR. ....	31
B.	Les co-régulateurs de AR et son recrutement sur l'ADN. ....	32
1.	Facteurs généraux de la transcription. ....	33
2.	Modulateurs positifs de l'état chromatinien. ....	34
a.	Remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP. ....	35
b.	Les co-activateurs de AR à activité HAT. ....	36
c.	Les co-activateurs de AR à activité histones méthyltransférases. ....	40
3.	Modulateurs négatifs de l'état chromatinien. ....	42
a.	Le modulateur HDAC1. ....	42
b.	Les co-répresseurs SMRT/N-CoR. ....	43
c.	Le récepteur orphelin SHP. ....	45
d.	La protéine ARR19. ....	46
4.	Coopération et association de AR et de ses co-régulateurs en complexes multi protéiques : exemple du promoteur du gène PSA. ....	46
C.	L'activité du récepteur des androgènes est contrôlée par différents acteurs de la signalisation et du cycle cellulaire. ....	49
1.	Acteurs de la signalisation cellulaire. ....	49
2.	Acteurs du cycle cellulaire. ....	52
D.	Autres partenaires de AR. ....	53
<b>III.</b>	<b>Implication des androgènes dans la physiopathologie. ....</b>	<b>55</b>
A.	Les pathologies associées à AR. ....	55
1.	Les insensibilités aux androgènes. ....	55
2.	Le syndrome de Kennedy. ....	57
3.	Le cancer de la prostate. ....	58
a.	La glande prostatique. ....	59
b.	Epidémiologie et facteurs de risque du cancer de la prostate. ....	60
c.	Stades d'évolution de la maladie. ....	62
B.	Aspects moléculaires associés à l'hormono-résistance du cancer de la prostate. ....	65
1.	Activation de AR dépendante du ligand. ....	65
a.	Amplification du gène AR. ....	65
b.	Les mutations activatrices de AR. ....	66
c.	Les co-activateurs de AR et le cancer de la prostate. ....	67
2.	Activation de AR indépendante de son ligand par différentes voies de signalisation intra-cellulaires. ....	69



a.	L'EGF/ EGF-R/HER2.....	70
b.	Les cytokines.....	71
c.	Le facteur de croissance IGF-1. ....	72
d.	Les protéines kinases PKC et PKA.....	73
3.	Autres mécanismes impliqués.....	75
a.	Résistance accrue des cellules cancéreuses à l'apoptose. ....	75
b.	Sélection clonale. ....	77
<b>Présentation du sujet.....</b>		<b>79</b>
<b>Résultats .....</b>		<b>86</b>
I.	Identification de la nucléophosmine/B23.1 comme un nouveau partenaire du récepteur des androgènes. ....	87
II.	La nucléophosmine interagit avec le récepteur des androgènes et contrôle son activité dans le cancer de la prostate. ....	89
III.	La nucléophosmine contrôle l'activité des récepteurs nucléaires ER, PR et GR.....	90
<b>Discussion, perspectives .....</b>		<b>92</b>
I.	Quel est l'intérêt de rechercher de nouveaux partenaires du récepteur des androgènes ? .....	93
II.	Quelle relation lie AR et NPM ? .....	95
III.	Comment interpréter le fait que la nucléophosmine interagisse préférentiellement avec AR dans des cellules en état de prolifération ? .....	96
IV.	Comment s'opère le contrôle de NPM sur AR ?.....	98
A.	Contrôle de l'activité transcriptionnelle de AR.....	98
B.	Contrôle du niveau d'accumulation de AR.....	100
V.	Quelle place donner à la nucléophosmine dans le cancer de la prostate et les autres cancers ? .....	101
A.	La nucléophosmine : un proto-oncogène ? .....	102
B.	La nucléophosmine : un suppresseur de tumeur ?.....	103
VI.	Quelle suite donner à ce travail ? .....	104
A.	L'interaction fonctionnelle AR/NPM.....	104
B.	La nucléophosmine et le cancer de la prostate.....	106
<b>Annexes .....</b>		<b>110</b>





\*\*\*\*\*

## ***Bibliographie***

\*\*\*\*\*



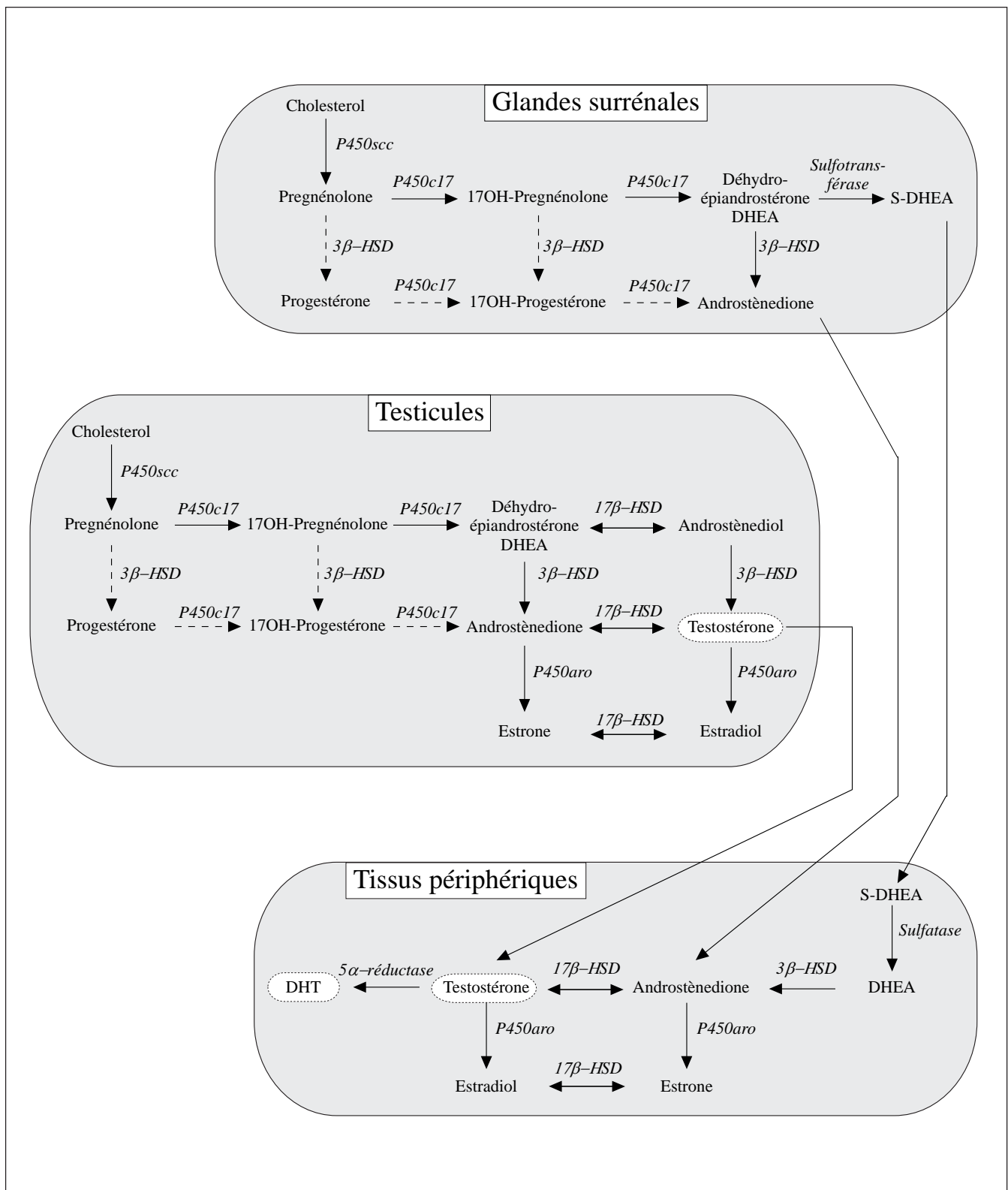
## **I. Les androgènes : physiologie et modes d'action.**

### **A. Les androgènes.**

#### **1. Les androgènes : hormones stéroïdes.**

On qualifie d'hormones les messagers moléculaires sécrétés par des cellules glandulaires (glande endocrine) et qui, libérés dans le milieu extracellulaire, sont véhiculés par la circulation sanguine pour contrôler à distance l'activité cellulaire et tissulaire (du grec *horman*, exciter). On distingue plusieurs classes d'hormones en fonction de leur nature biochimique et de leur mécanisme d'action : les hormones peptidiques ou protéiques telles que le glucagon ou les hormones de croissance, les hormones monoaminées dérivées de l'acide aminé tyrosine telles que la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4 ou *tétraiodothyronine*) ainsi que l'adrénaline et enfin, les hormones stéroïdes synthétisées à partir du cholestérol.

Les principaux tissus responsables de la stéroïdogénèse (synthèse des hormones stéroïdes) sont les glandes surrénales et les gonades (testicules et ovaires). Chez l'homme, les glucocorticostéroïdes (cortisol et corticostérone) et les minéralo-corticostéroïdes (aldostérone) sont synthétisés dans les cortico-surrénales. Les œstrogènes (œstrone E1, 17 $\beta$ -estradiol E2) proviennent de l'aromatisation de certains androgènes comme la  $\Delta$ 4-androstènedione ( $\Delta$ 4-dione) et la testostérone, qui a lieu essentiellement dans les ovaires mais aussi dans les glandes mammaires chez la femme et dans les testicules et tissus périphériques chez l'homme. Enfin, les androgènes sont divisés en deux classes : les androgènes surrénaliens (la déhydroépiandrostérone ou DHEA ; son ester sulfate, le S-DHEA ; et la  $\Delta$ 4-androstènedione), qui sont produits dans la cortico-surrénale, et les androgènes d'origine testiculaire (la Testostérone et son dérivé 5 $\alpha$  réduit au niveau des tissus périphériques: la dihydrotestostérone ou DHT).



**Figure n°1: Voies de biosynthèse des androgènes.**

La synthèse de testostérone à partir du cholestérol est assurée par la voie  $\Delta^4$  (flèches en pointillés) et  $\Delta^5$  (flèches pleines) cette dernière étant majoritaire chez l'espèce humaine.

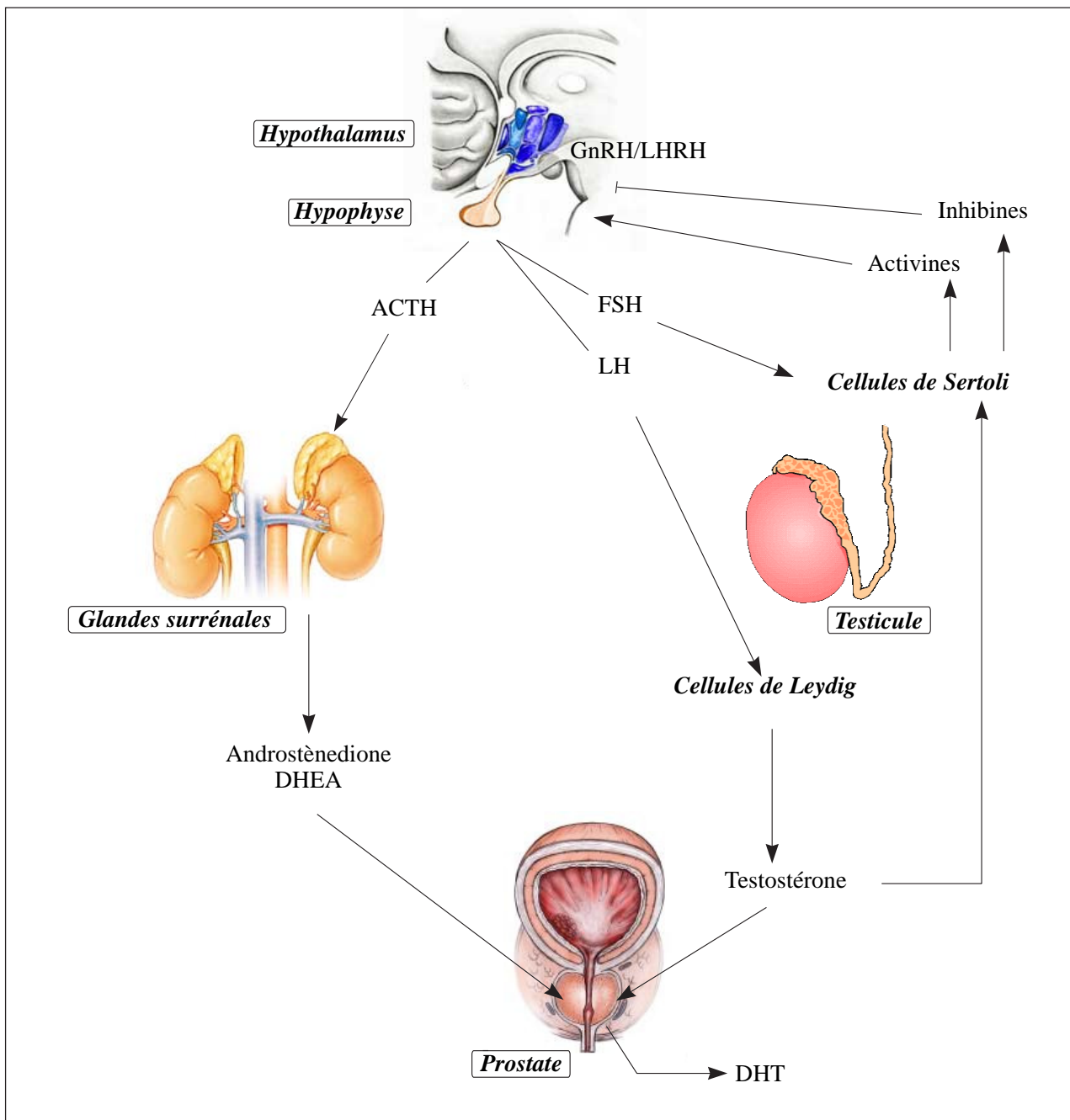
*P450<sub>scc</sub>*, cytochrome P450 side chain clivage; *3β-HSD*, 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase; *P450<sub>c17</sub>*, cytochrome P450 17α-hydroxylase/17,20 lyase; *17β-HSD*, 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase; DHEA, déhydroépiandrostérone; DHT, dihydrotestostérone; *P450<sub>aro</sub>*, cytochrome P450 aromatasase.

## 2. Bio-synthèse des androgènes.

Chez l'homme, la testostérone est le principal androgène circulant. Elle est produite en très grande majorité dans le testicule (95%) par les cellules de Leydig situées entre les tubes séminifères. Le précurseur des androgènes est le cholestérol dont les origines sont multiples : il peut être soit produit à partir de l'acétate intra-cellulaire, soit extrait des lipoprotéines plasmatiques, notamment de la fraction de faible densité (LDL) (Freeman and Ascoli, 1982), ou encore issu des membranes cellulaires (Nagy and Freeman, 1990). A l'intérieur de la cellule de Leydig, le cholestérol est pris en charge et transporté à l'intérieur de la mitochondrie par une protéine de transfert dite protéine activatrice de la stéroïdogénèse StAR : *Steroidogenic acute regulatory protein*. Ce transfert intra-mitochondrial du cholestérol représente l'étape limitante de la stéroïdogénèse et est régulé par la gonadostimuline LH (*luteinizing hormone*) (Clark and Stocco, 1995). Dans la mitochondrie, le début de la cascade de la stéroïdogénèse est marqué par le clivage du cholestérol (C27) en prégnénolone (C21) par le complexe cytochrome P450<sub>scc</sub> (P450 side chain cleavage) (**figure n°1**). La prégnénolone est exportée dans le réticulum endoplasmique où elle peut alors être convertie en plusieurs stéroïdes à 19 carbones. Deux voies sont possibles avant d'aboutir à la testostérone : la voie  $\Delta 4$  et la voie  $\Delta 5$  qui représente la voie préférentielle chez l'homme. Dans cette dernière, la prégnénolone est transformée successivement par le cytochrome P450<sub>c17</sub> en 17 $\alpha$ -hydroxy-prégnénolone puis en DHEA qui après intervention des enzymes 3 $\beta$ - et 17 $\beta$ -HSD (*hydroxystéroïde déshydrogénase*), est réduite en testostérone.

La testostérone peut alors passer librement à travers la membrane des cellules de Leydig, imprégner les différents compartiments testiculaires puis diffuser dans le sang veineux. Dans le plasma, la testostérone circule sous trois formes : 2% sous forme libre, 45 à 75% liée à des protéines de transport appelée TeBG (*testosterone binding-globulin*) ou SHBG (*sex hormone binding globulin*) et 30 à 55% sous forme liée à l'albumine (Clark and Stocco, 1995; Rosner, 1991). Au niveau de certains tissus cibles comme la prostate, les vésicules séminales ou la peau, la testostérone est 5 $\alpha$ -réduite en DHT qui est un androgène plus affiné que la testostérone pour leur récepteur. La réaction est catalysée par l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase dont la déficience de l'isoforme de type 2 peut être à l'origine d'un pseudohermaphrodisme chez l'homme (Andersson et al., 1991).

La DHEA et l'androstènedione sont également produits par la surrénale. Si l'on considère que seulement 1% de la testostérone sérique provient de la DHEA, à l'intérieur même des cellules,



**Figure n°2: Contrôle de la biosynthèse des androgènes par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.**

Les gonadostimulines FSH et LH produites par l'hypophyse stimulent la synthèse de testostérone au niveau testiculaire par les cellules de Leydig. En réponse à la FSH, les cellules de Sertoli libèrent des activines et inhibines qui exercent un rétrocontrôle positif et négatif respectivement sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. L'ACTH également produite par l'hypophyse, induit la synthèse de DHEA et d'androstènedione au niveau des glandes surrénales. La prostate représente ici un des tissus périphériques cibles des androgènes surrénaux et testiculaires. Ce tissu possède une activité 5 $\alpha$ -réductase responsable de la conversion de la testostérone en DHT.

ACTH, adreno corticotropic hormone; DHEA, déhydroépiandrostérone; DHT, dihydrotestostérone; FSH, folliculo-stimulating hormone; GnRH, gonadotropin releasing hormone; LH, luteinizing hormone; LHRH, luteinizing hormone releasing hormone.

30 à 50% de la synthèse des androgènes proviendraient de la transformation de la DHEA au sein même de certains tissus cibles. Ce concept d'intracrinologie (Labrie, 1991) a été proposé par le laboratoire du Dr F. Labrie après avoir montré que les cellules prostatiques sont capables de transformer elle-mêmes les précurseurs surrénaliens (DHEA et androstènedione) en DHT (Labrie et al., 1988). Dans ce système, la DHT agit directement dans la cellule où la synthèse a eu lieu, sans être libérée dans le milieu extracellulaire, d'où la notion d'effet intracrine par opposition aux effets auto/para/endocrines. Ainsi, la DHEA serait d'une part transformée en androgènes par les testicules mais aussi par des organes ou tissus périphériques qui possèdent les enzymes nécessaires à cette bioconversion : tissu adipeux, peau, prostate, os ou cerveau (Belanger et al., 2002; Labrie et al., 1988; Labrie et al., 2001; Martel et al., 1994).

Un autre androgène surrénalien est le S-DHEA : c'est le dérivé sulfate de la DHEA qui représente une réserve importante de DHEA en raison de sa demi-vie longue et de son interconversion continue avec la DHEA (enzymes sulfotransférase/sulfatase).

### 3. Contrôle de la production des androgènes par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

La synthèse des androgènes est sous la dépendance de l'axe neuro-endocrine hypothalamo-hypophysaire (**figure n°2**). L'hypothalamus situé à la base du cerveau libère de façon pulsatile la gonadolibérine GnRH aussi appelée LHRH (*gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone releasing hormone*) dans le système porte hypophysaire. En réponse à cette stimulation, les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse synthétisent et libèrent deux hormones: les gonadotrophines LH (*luteinizing hormone*) et FSH (*follicle-stimulating hormone*). Ces hormones sont des glycoprotéines à deux chaînes : une chaîne  $\alpha$  identique et une chaîne  $\beta$  spécifique de chacune des hormones. Alors que la LH stimule la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig, la FSH induit la production d'activines et d'inhibines par les cellules de Sertoli. Cette spécificité d'action se fait grâce à la localisation de leur récepteur respectif sur les cellules de Leydig pour la LH ou de Sertoli pour la FSH. La testostérone ainsi que les inhibines vont alors exercer un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire alors que les activines exercent un rétrocontrôle positif sur ce même axe.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu par la LH sont désormais bien connus. Elle agit via des récepteurs membranaires de type GPCR (*G protein-coupled receptor*) associés à





l'adénylate cyclase (McFarland et al., 1989). Ainsi la fixation de la LH au niveau de la membrane de la cellule de Leydig entraîne la formation d'AMPc (*adénosine monophosphate cyclique*) qui active la protéine kinase A (Dufau, 1998). La stimulation de cette voie induit l'expression des gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse tels que StAR (Clark and Stocco, 1995), le cytochrome P450<sub>scc</sub> (Hales et al., 1990) ou encore la 3 $\beta$ -HSD (Keeney and Mason, 1992), favorisant ainsi la production de testostérone. Néanmoins il semble que la régulation de la stéroïdogénèse soit beaucoup plus complexe et implique un réseau important de voies de signalisation telles que celle mobilisant la PKC (*protein kinase C*) (Leung and Steele, 1992; Stocco et al., 2005).

La régulation de la stéroïdogénèse testiculaire ne s'exerce pas exclusivement par l'intermédiaire de la LH. En effet plusieurs facteurs produits localement peuvent réguler la production d'androgènes de façon paracrine ou autocrine. On note parmi ces composés les facteurs de croissance IGF1 (*insulin like growth factor-I*), TGF $\alpha$  et  $\beta$  (*transforming growth factor  $\alpha$  et  $\beta$* ), EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblastic growth factor*) (Saez, 1994) ou encore les cytokines IL1 $\alpha$  et  $\beta$  (*interleukine 1  $\alpha$  et  $\beta$* ) (Bornstein et al., 2004). Il faut aussi noter la régulation de la stéroïdogénèse par les hormones thyroïdiennes qui régulent entre autre le taux de transcrits de StAR ou encore certaines enzymes de la stéroïdogénèse (Ariyaratne et al., 2000; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2004) et les glucocorticoïdes qui ont plutôt une action inhibitrice de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig en réponse au stress (Monder et al., 1994).

Enfin, la production des androgènes surrénaliens est principalement régulée par une hormone synthétisée et sécrétée par l'adénohypophyse : l'ACTH (*adreno corticotropic hormone*). Sa production est régulée par un rétrocontrôle négatif exercé sur l'axe hypothalamo-hypophysaire par le cortisol.

#### 4. Effets physiologiques des androgènes.

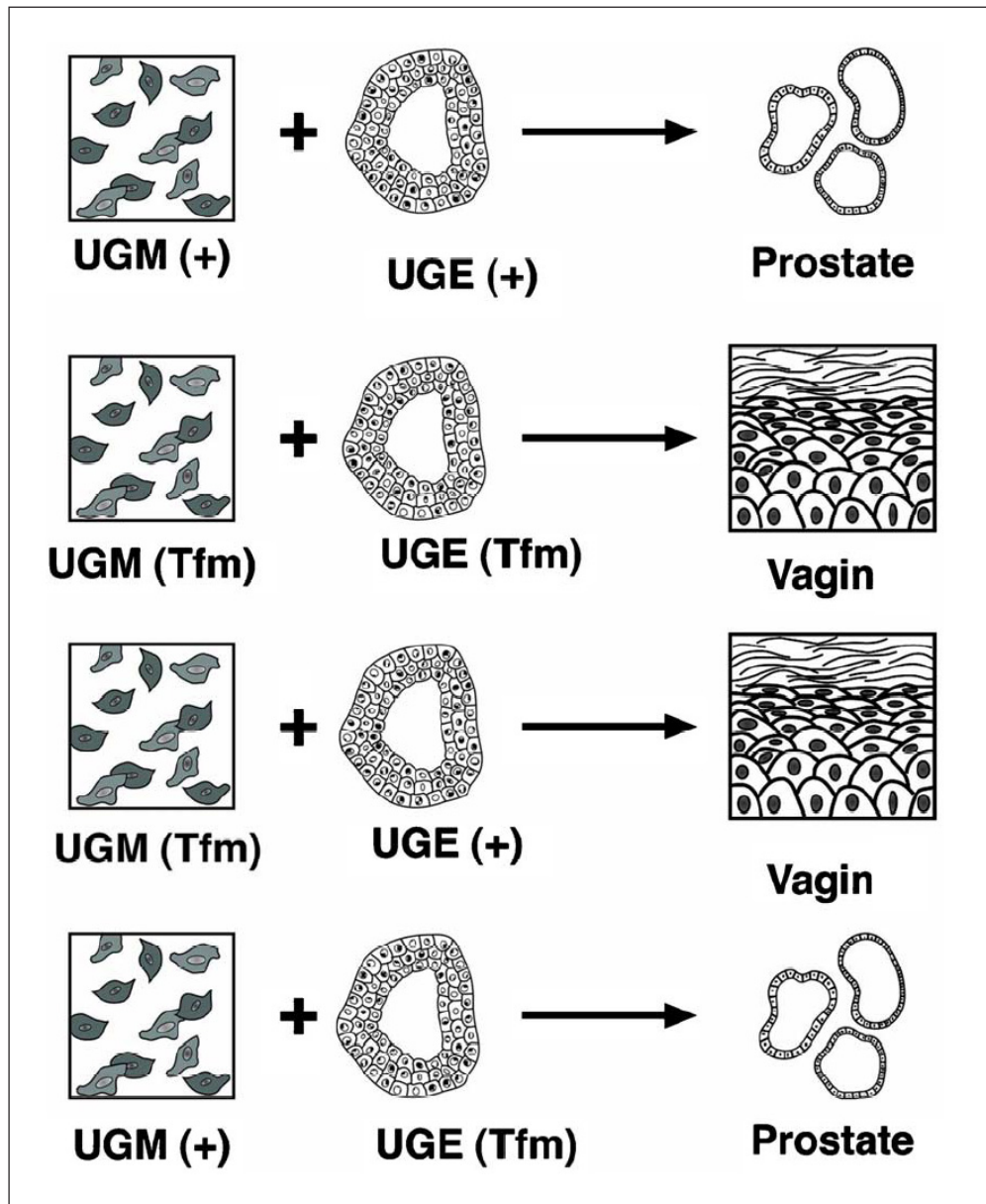
Les androgènes actifs, DHT et testostérone, possèdent des effets biologiques pléiotropiques : ils sont nécessaires au déterminisme du sexe au cours de l'embryogenèse, ils exercent des effets hypertrophiques et hyperplasiques sur les organes sexuels secondaires mâles, ont un effet anabolisant sur les muscles squelettiques, ils participent au développement de l'os, au métabolisme du tissu adipeux ou encore à la masculinisation du cerveau.



#### a. Développement et maintien du tractus génital mâle.

Le développement du tractus et des organes génitaux mâles commence durant les premiers stades embryonnaires avec la formation d'un testicule à partir d'une ébauche indifférenciée. Le gène initiateur et déterminant de la différenciation testiculaire est *SRY* (*sex determining region Y*) qui se situe sur le bras court du chromosome Y (Sinclair et al., 1990) et qui agit en se liant à l'ADN grâce à sa boîte HMG (*high mobility group*). D'autres facteurs dont SF1 (*steroidogenic factor 1*), DAX1 (*dosage-sensitive adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1*), SOX9 (*sex determining region Y, box 9*), ou WT1 (*wilm's tumour 1*) interagissent avec SRY et conduisent à la différenciation fonctionnelle du testicule (McElreavey and Fellous, 1999). A sept semaines de gestation, les cellules de Sertoli deviennent actives et synthétisent l'AMH (*anti-müllerian hormone*) qui permet la régression des canaux de Müller à l'origine des trompes de Fallope, de l'utérus, du col de l'utérus et de la partie supérieure du vagin chez la femelle. Les cellules de Leydig s'activent à la huitième semaine de gestation et les androgènes qu'elles synthétisent sont responsables de la différenciation morphogénétique des canaux de Wolff en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales. Ils participent aussi à la maturation des canaux du mésonéphros, du sinus urogénital et du tubercule génital en appareil génital mâle interne et externe. Ainsi, les androgènes jouent un rôle critique au moment de la différenciation du tractus génital au cours de la période embryonnaire et leur absence chez un individu de génotype mâle aboutit à la formation d'un individu de phénotype femelle. De même, des souris invalidées pour le récepteur des androgènes (AR) qui est le médiateur du signal hormonal, présentent des organes génitaux de type féminin ou ambigus (Yeh et al., 2002).

Chez l'homme, la prostate, organe sexuel secondaire, fonctionne comme un organe sécréteur composé notamment de deux compartiments cellulaires distincts, l'épithélium et le stroma. Le stroma est un tissu fibromusculaire qui porte le tissu épithélial. Les cellules épithéliales basales et lumenales délimitent le lumen et les canaux sécréteurs. Le rôle des interactions entre les cellules du mésenchyme et de l'épithélium dans le développement uro-génital des organes sexuels secondaires a largement été étudié par Cunha et ses associés à l'aide de combinaisons de tissus mésenchymateux et épithéliaux issus de souris normales ou Tfm (*testicular feminized*) (Cunha and Chung, 1981). Les souris Tfm présentent une mutation du récepteur des androgènes, ce qui inhibe sa fonction et rend les animaux insensibles aux androgènes. Les souris mâles Tfm développent des testicules mais la différenciation des canaux de Wolff ne se fait pas ; les souris présentent un phénotype sexuel ambigu. Différentes combinaisons de



**Figure n°3: Le mésenchyme est le médiateur de l'effet des androgènes sur l'épithélium au cours du développement.**

Différentes combinaisons de mésenchymes (UGM) et d'épithélia (UGE) uro-génitaux provenant de souris mâles sauvages (+) ou Tfm (testicular feminized) ont été greffées en combinaison chez des souris mâles adultes. La combinaison UGM+/UGE+ aboutit à la formation de tissu prostatique fonctionnel. Les combinaisons UGM.Tfm/UGE.Tfm et UGM.Tfm/UGE+ aboutissent au développement d'un tissu de type vagin. La combinaison UGM+/UGE.Tfm permet le développement morphologique de type prostatique avec formation des canaux, prolifération des cellules épithéliales et la cytodifférenciation des cellules luminales. En revanche, il n'existe pas production de marqueurs prostatiques en raison de l'absence d'un récepteur des androgènes fonctionnel au niveau de l'épithélium Tfm. Tfm: testicular feminized. D'après Cunha et al. 2004.

mésenchymes et d'épithélia uro-génitaux ont été greffées chez des souris mâles ; les observations recueillies sur le développement des tissus sont répertoriées dans la **figure n°3**. De ces différents résultats se dégagent plusieurs conclusions : la signalisation androgénique des cellules épithéliales n'est pas suffisante pour le développement morphologique de la prostate alors que celle des cellules mésenchymateuses est nécessaire et suffisante. De plus, ces observations mettent en évidence l'existence de facteurs paracrines synthétisés par les cellules mésenchymateuses en réponse aux androgènes qui régulent la fonction et la survie des cellules épithéliales. La signalisation androgénique des cellules épithéliales intervient dans des processus de différenciation cellulaire terminaux tels que la production de molécules sécrétées conférant à l'organe sa fonction propre (Cunha and Young, 1991; Donjacour and Cunha, 1993). Si ces relations stroma-épithélium s'exerçant par l'intermédiaire de facteurs de croissance paracrines sous contrôle des androgènes ont été mises en évidence dans le développement des organes sexuels secondaires (Cunha, 1996), elles sont aussi largement documentées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire prostatique (Russell et al., 1998).

Le rôle primordial des androgènes dans le maintien des organes sexuels secondaires et de leurs épithélia tels que celui de la prostate a été démontré par des expériences de castration : la réduction des niveaux de DHT sériques et prostatiques après castration résulte en une perte par apoptose de 70% des cellules épithéliales sécrétrices de la prostate (English et al., 1989; Kyprianou and Isaacs, 1988) qui peut-être compensée par une supplémentation en androgènes (English et al., 1987). Un mécanisme clef de cette régression de la prostate semble être lié à sa vascularisation. En effet, la dégénérescence des capillaires prostatiques et la constriction des vaisseaux sanguins après castration précèdent l'apoptose des cellules épithéliales (Buttayan et al., 2000; Buttayan et al., 1999) et l'administration de testostérone à des rats castrés résulte en une croissance vasculaire prostatique suivie par la reconstruction de l'épithélium sécrétoire (Franck-Lissbrant et al., 1998). Néanmoins, les cellules endothéliales de la prostate ventrale de rat n'expriment pas le récepteur des androgènes qui est le médiateur de l'action de la testostérone et de la DHT. De plus, les cellules stromales de la prostate ne semblent pas sensibles à une castration. Ainsi, des mécanismes relayant l'action des androgènes sont impliqués dans le maintien des épithélia prostatiques. La production de certains facteurs de croissance tels que le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) ou le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) par les cellules stromales pourrait être régulée par les androgènes et influencer la survie des cellules de l'endothélium vasculaire (Burchardt et al., 2000; Haggstrom et al., 1998). La castration agirait alors négativement sur la production de ces facteurs de croissance par les cellules stromales, ce qui se traduirait par un défaut de



vascularisation et une apoptose induite des cellules épithéliales. Ces observations valident le rôle clef des facteurs de croissance paracrines produits en réponse aux androgènes et nécessaires au maintien de l'intégrité des organes sexuels secondaires.

Enfin, il faut noter que les androgènes jouent également un rôle important au moment de la puberté. En effet, la mise en place des caractères sexuels secondaires, tels que le développement de la pilosité, la mue vocale ou l'acquisition de la fonction reproductrice (la FSH étant un autre acteur majeur de la spermatogenèse), se fait après une forte augmentation du taux d'androgènes plasmatiques.

#### b. Les androgènes et la physiologie musculaire.

Le rôle des testicules sur le maintien de la composition corporelle est reconnu depuis très longtemps et grâce à de nombreuses études, l'effet anabolisant des androgènes sur le muscle squelettique est désormais clairement établi (Baumgartner et al., 1999; van den Beld et al., 2000). Un premier élément en faveur d'une action des androgènes sur le muscle est la présence de leur récepteur (Michel and Baulieu, 1980) qui possède les mêmes caractéristiques de liaison que dans les autres tissus (Saartok et al., 1984). La testostérone est l'androgène majeur dans le muscle, la DHT n'étant présente qu'à de faibles concentrations. Plusieurs rapports indiquent que les androgènes induiraient une hypertrophie des fibres musculaires en agissant sur les voies de régulation de la synthèse protéique et la différenciation musculaire (Bhasin et al., 2003; Ferrando et al., 2003; Singh et al., 2003). Les effets anabolisants des androgènes sur le muscle impliquent notamment une interaction avec le système IGF1 (*insuline-like growth factor I*). Il est admis que l'IGF1 augmente la synthèse protéique du muscle squelettique (Fryburg et al., 1995). La testostérone a été montrée comme ayant un effet positif sur la production des ARNm (*acide ribonucléique messenger*) d'IGF1 et au contraire, un effet négatif sur les ARNm de la protéine inhibitrice IGF-BP4 (*IGF-binding protein 4*) dans le muscle squelettique amplifiant ainsi le signal anabolisant (Kamel et al., 2002; Urban et al., 1995). En augmentant la synthèse des protéines, les androgènes produisent des effets myotrophiques sur la masse musculaire squelettique. L'effet anabolisant de la testostérone serait également expliqué par son action antiglucocorticoïde (Eason et al., 2003; Hickson et al., 1990). Cette hypothèse est basée sur plusieurs résultats expérimentaux, notamment une prévention par la testostérone de l'atrophie musculaire induite par une administration de glucocorticoïdes (Eason et al., 2003). Néanmoins, la démonstration

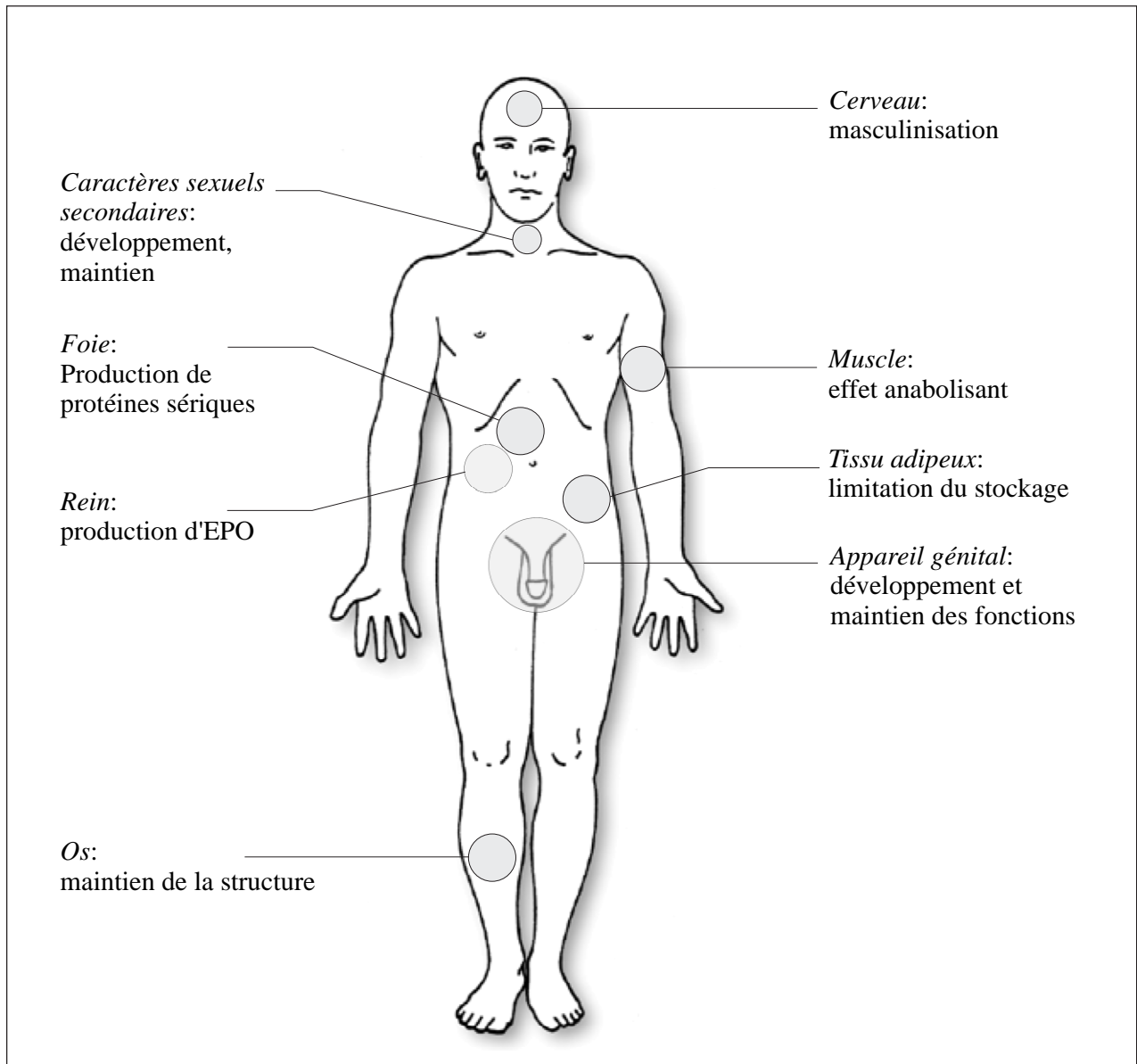




moléculaire d'un croisement entre les voies initiées par les androgènes et les glucocorticoïdes basée sur la forte homologie entre leurs récepteurs ou une interférence entre leurs éléments de réponse hormonaux reste encore à faire. Enfin, les androgènes pourraient jouer un rôle anabolisant en inhibant l'expression du gène de la myostatine (Marcell et al., 2001) membre de la superfamille des TGF $\beta$  qui est un régulateur autocrine et paracrine de la croissance musculaire (Walsh and Celeste, 2005).

### c. Les androgènes et la physiologie osseuse.

Les androgènes sont largement connus pour leurs effets bénéfiques majeurs sur le développement et le maintien du squelette (Orwoll and Klein, 1995). Néanmoins, leur action physiologique sur l'os est fortement corrélée à celle d'autres hormones stéroïdes, les œstrogènes. Le rôle des œstrogènes a été mis en évidence chez des souris invalidées pour le gène codant ER $\alpha$  (*estrogen receptor  $\alpha$* ) et la P450 aromatase responsable de la conversion de la testostérone en œstrogènes puisque ces souris présentent une ostéoporose (Oz et al., 2001; Windahl et al., 2002). Ainsi, une partie des effets bénéfiques des androgènes sur l'os passerait par leur aromatisation en œstrogènes (Yanase et al., 2003). Ces observations sont confortées par la présence des enzymes nécessaires à la synthèse d'estradiol à partir de la DHEA et de l'androstènedione dans les cellules osseuses ostéoblastiques. Néanmoins, l'expression du récepteur des androgènes a été mise en évidence dans les ostéoblastes qui synthétisent l'os, dans les ostéoclastes qui le dégradent mais aussi dans les cellules du cartilage de croissance qui assurent la croissance osseuse longitudinale (Abu et al., 1997; Colvard et al., 1989; Van Der Eerden et al., 2002). De plus, des souris invalidées pour le récepteur des androgènes présentent des désordres osseux de type ostéopénie (Yeh et al., 2002). Le rôle des androgènes sur la physiologie de l'os semble donc multiple et complexe. Ils agiraient d'une part sur la densité minérale osseuse et sur le renouvellement périodique de l'os par des cycles de résorption/genèse de l'os réalisés par les ostéoblastes et les ostéoclastes. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence une diminution de la densité minérale osseuse, une détérioration de l'architecture trabeculaire osseuse (Benito et al., 2003) et une augmentation du risque de fracture chez des sujets hypogonadiques pouvant être compensées par une supplémentation en androgènes (Baran et al., 1978; Francis et al., 1986). Il a également été montré que les androgènes, testostérone et DHT, ont la capacité d'induire la prolifération des précurseurs d'ostéoblastes, de favoriser la différenciation d'ostéoblastes matures mais aussi



**Figure n°4: Principaux effets physiologiques des androgènes sur le développement et le fonctionnement de l'organisme humain mâle.**

d'inhiber leur apoptose (Kousteni et al., 2002; Manolagas et al., 2002). Des souris invalidées pour AR présentent une augmentation du taux de renouvellement osseux avec une augmentation plus importante de la résorption que de la formation osseuse aboutissant à l'ostéopénie (Kawano et al., 2003). Ainsi les androgènes auraient un rôle protecteur sur le remodelage osseux en inhibant la résorption par les ostéoclastes.

Le but de ce chapitre n'étant pas de faire une liste exhaustive de l'action des androgènes dans le développement et l'homéostasie tissulaire mais plutôt d'apprécier leurs effets pléiotropiques, certains aspects de l'action des androgènes et de leurs tissus cibles présentés en *figure n°4* ne seront pas abordés. Néanmoins, l'invalidation du récepteur des androgènes chez la souris révèle qu'ils sont largement impliqués dans la distribution du tissu adipeux (Sato et al., 2003) ou encore la masculinisation du cerveau (Sato et al., 2004) et dans le maintien des fonctions cérébrales (Goldstein and Sengelaub, 1992).

## **B. Le récepteur des androgènes appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires.**

### **1. La superfamille des récepteurs nucléaires (NRs).**

#### **a. Généralités.**

Les hormones liposolubles qui peuvent diffuser à travers la membrane plasmique des cellules mais aussi les métabolites tels que les vitamines ou encore certains dérivés lipidiques agissent comme des messagers chimiques à l'intérieur même des cellules pour transduire un signal. La famille des récepteurs nucléaires (NRs) est représentée par des molécules qui vont relayer ce signal de façon spécifique en se liant à l'ADN (*acide désoxyribonucléique*) pour contrôler l'expression de gènes cibles impliqués dans les grandes fonctions de l'organisme telles que le métabolisme, le développement ou la reproduction. Les NRs sont des facteurs de transcription inductibles par fixation à un ligand ; pour un certain nombre de ces récepteurs, le ligand est toujours inconnu. Les premiers NRs identifiés ont été les récepteurs des hormones stéroïdes sexuelles (œstrogènes) à la fin des années 1960 (Toft et al., 1967). Dans les années 1980, le

	Récepteur	Sous-type	Dénomination	Ligand	Site de fixation à l'ADN	Monomère, Homodimère ou Hétérodimère
Class I	TR	$\alpha, \beta$	Thyroid hormone receptor	Thyroid hormone ( $T_3$ )	Pal, DR-4, IP	H
	RAR	$\alpha, \beta, \gamma$	Retinoic acid receptor	Retinoic acid	DR-2, DR-5	H
	VDR		Vitamin D receptor	1-25(OH) $_2$ vitamin D $_3$	Pal, IP	H
	PPAR	$\alpha, \beta, \gamma$	Peroxisome proliferator activated receptor	Benzotriene B4; Wy 14.643 Eicosanoids; thiazolidinediones (TZDs); 15-deoxy-12,41-prostaglandin J $_2$ ; polyunsaturated fatty acids	DR-3, IP-9 DR-1	H
	PXR		Pregnane X receptor	Pregnanes; C21 steroids	DR-3	H
	CAR/MB67	$\alpha, \beta$	Constitutive androstane receptor	Androstanes; 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene	DR-5	H
	LXR	$\alpha, \beta$	Liver X receptor	Oxysterols	DR-4	H
	FXR		Farnesoid X receptor	Bile acids	DR-4, IR-1	H
	RevErb	$\alpha, \beta$	Reverse ErbA	Unknown	DR-2, Hemisite	M, D
	RZR/ROR	$\alpha, \beta, \gamma$	Retinoid Z receptor/retinoic acid-related orphan receptor	Unknown	Hemisite	M
Class II	UR		Ubiquitous receptor	Unknown	DR-4	H
	RXR	$\alpha, \beta, \gamma$	Retinoid X receptor	9- <i>Cis</i> -retinoic acid	Pal, DR-1	D
	COUP-TF	$\alpha, \beta, \gamma$	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor	Unknown	Pal, DR-5	D, H
	HNF-4	$\alpha, \beta, \gamma$	Hepatocyte nuclear factor 4	Fatty acyl-CoA thioesters	DR-1, DR-2	D
	TLX		Tailles-related receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D
Class III	PNR		Photoreceptor-specific nuclear receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D
	TR2	$\alpha, \beta$	Testis receptor	Unknown	DR-1 to DR5	D, H
	GR		Glucocorticoid receptor	Glucocorticoids	Pal	D
	AR		Androgen receptor	Androgens	Pal	D
	PR		Progesterone receptor	Progestins	Pal	D
	ER	$\alpha, \beta$	Estrogen receptor	Estradiol	Pal	D
	ERR	$\alpha, \beta, \gamma$	Estrogen-related receptor	Unknown	Pal, Hemisite	M, D
Class IV	NGFI-B	$\alpha, \beta, \gamma$	NGF-induced clone B	Unknown	Pal, DR-5	M, D, H
Class V	SF-1/FTZ-F1	$\alpha, \beta$	Steroidogenic factor 1 Fushi Tarazu factor 1	Oxysterols	Hemisite	M
Class VI	GCNF		Germ cell nuclear factor	Unknown	DR-0	D
Class 0	SHP		Small heterodimeric partner	Unknown		H
	DAX-1		Dosage-sensitive sex reversal	Unknown		

**Figure n°5: Classification des récepteurs nucléaires chez les mammifères.**

M, Monomer; D, homodimer; H, heterodimer; Pal, palindrome; DR, direct repeat; IP, inverted palindrome; NGF, nerve growth factor. D'après Aranda and Pascual 2001.

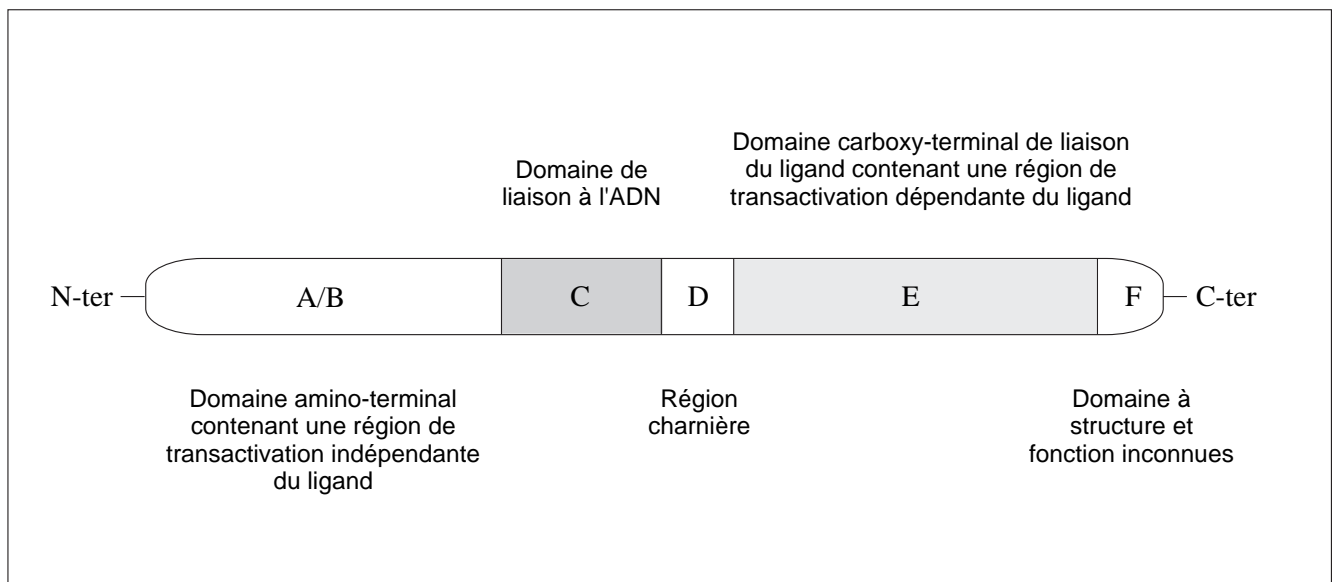
premier NR cloné a été le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et al., 1985). Depuis, quarante huit NRs ont été identifiés chez l'homme. En recoupant les homologies de séquence des différents NRs, ils ont été classés en six voire sept grandes sous-familles regroupées dans la **figure n°5** (dans le tableau, ces sous-familles sont dénommées *Class*) (Aranda and Pascual, 2001; Laudet, 1997). Laudet a de plus soulevé l'hypothèse que tous ces NRs dériveraient d'un ancêtre commun. Il suggère que les facteurs de transcription ancestraux pouvaient agir de façon constitutive et n'auraient acquis leur capacité à lier un ligand spécifique que secondairement (Laudet, 1997). L'importance des NRs est mise en évidence par leur implication dans de nombreux processus pathologiques tels que l'association de ER avec la croissance du cancer du sein (Shao and Brown, 2004), GR dans le contrôle des processus inflammatoires (Kino et al., 2003) ou encore les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) dans les maladies métaboliques telles que le diabète (Kersten et al., 2000).

#### b. Les différentes classes de récepteurs nucléaires.

Les NRs peuvent être classés en trois grandes catégories en fonction de la nature de leur ligand. On décrit les récepteurs de classe I qui sont les récepteurs des hormones stéroïdes, les récepteurs de classe II ou récepteurs aux hormones non-stéroïdes et enfin une troisième catégorie comprend les récepteurs orphelins pour lesquels le ligand n'a pas encore été identifié.

Les récepteurs des hormones stéroïdes sont le récepteur des androgènes, le récepteur des œstrogènes, le récepteur des glucocorticoïdes, celui des minéralocorticoïdes (MR) et enfin celui de la progestérone (PR). D'un point de vue moléculaire, ces différents types de récepteurs agissent en se liant à l'ADN sous forme d'homodimères. Leurs actions physiologiques sont très larges puisqu'ils déterminent le développement sexuel, le maintien des fonctions reproductrices, le métabolisme de nombreux organes ou encore la physiologie générale des organismes en contrôlant le système immunitaire pour les glucocorticoïdes ou la pression artérielle pour l'aldostérone.

Les récepteurs des hormones non stéroïdes sont multiples. Il faut noter que contrairement aux récepteurs stéroïdiens, ils ont la capacité de former des hétérodimères avec le récepteur nucléaire RXR (*retinoic X receptor*). Ce dernier, cloné en 1990 par l'équipe du Dr Mangelsdorf (Bavner et al., 2005) est le récepteur de l'acide 9 cis rétinoïque. Depuis, de

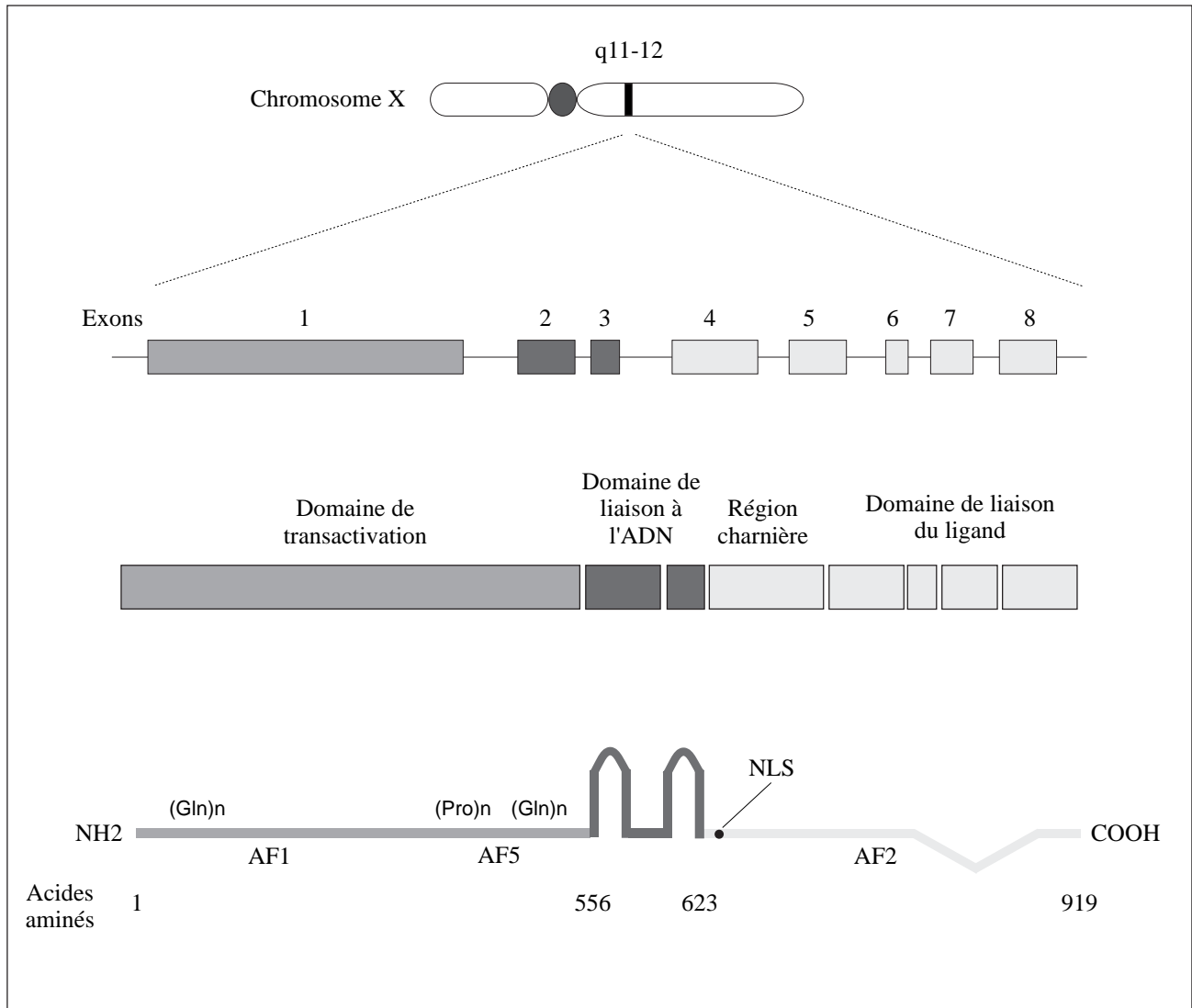


**Figure n°6: Structure schématique des récepteurs nucléaires.**

nombreux autres récepteurs nucléaires ont été identifiés : PXR (*pregnane X receptor*) qui participe à la régulation des stéroïdes et des stérols dans le foie et l'intestin, FXR (*farnesoid X receptor*) qui régule la bio-synthèse des acides biliaires et le catabolisme du cholestérol (Makishima et al., 1999) ou encore LXR (*liver X receptor*) récepteur des oxystérols (Apfel et al., 1994; Willy et al., 1995) impliqué dans le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol (Peet et al., 1998) dans de nombreux organes. Cette famille de récepteur comprend également le récepteur de la vitamine D (VDR), impliquée dans la croissance osseuse et le métabolisme du calcium, et le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR).

Les récepteurs orphelins sont des protéines dont la structure présente une forte identité avec les autres NRs mais dont le ligand naturel n'a pas encore été identifié. Parmi ceux-ci on compte notamment SF1 et DAX1 dont les actions antagonistes sont impliquées dans le développement embryonnaire et dans le maintien des fonctions testiculaires, ovariennes et surréaliennes (Iyer and McCabe, 2004; Val et al., 2003). Le NR orphelin COUP-TF (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*) est lui, fortement impliqué dans l'organogenèse, la neurogenèse et la différenciation cellulaire au cours du développement (Park et al., 2003). Enfin il faut noter l'importance d'un autre récepteur nucléaire orphelin qui est SHP (*short heterodimer partner*) dont la structure, le mode d'action et les fonctions sont différents de ceux des autres NRs. En effet si SHP possède un domaine de liaison de ligand putatif, il ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. Il présente néanmoins une forte identité avec DAX1. Ainsi SHP agirait en modulant l'activité d'autres NRs par des mécanismes de compétition, d'inhibition par recrutement d'autres facteurs ou d'inhibition de fixation à l'ADN des NRs (Bavner et al., 2005). Par ces interférences il va ainsi participer à la stéroïdogenèse, au métabolisme du cholestérol et du glucose ou encore à la réponse immunitaire.

A l'exception de certains NRs tels que SHP ou DAX, la famille des récepteurs nucléaires présente une structure très conservée avec des grands domaines (5 à 6) assurant des fonctions spécifiques (**figure n°6**). Ces domaines sont nommés de A à F avec une région amino terminale variable (région A/B), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) (domaine C), une région charnière (domaine D) et le domaine de liaison du ligand (domaine E). Certains récepteurs tel que ER possèdent en plus une extension carboxy-terminale (domaine F) dont le rôle est inconnu. Le chapitre suivant sera consacré à l'étude de la structure du récepteur des androgènes.



**Figure n°7: Structure du récepteur des androgènes humain.**

Le gène codant pour le récepteur des androgènes se situe sur le chromosome X en région q11-12. Il est constitué de huit exons qui codent pour une protéine de 919 acides aminés et d'un poids moléculaire de 110 kDa chez l'homme. Le domaine de transactivation comprend deux domaines de transactivations AF1 (Activating Function 1) et AF5 ainsi que plusieurs répétitions de glycines (Gln) et de prolines (Pro). Le domaine de liaison à l'ADN est formé de deux doigts de zinc, le domaine charnière Hinge comprend un signal de localisation nucléaire (NLS) et le domaine de liaison du ligand contient un domaine AF2.

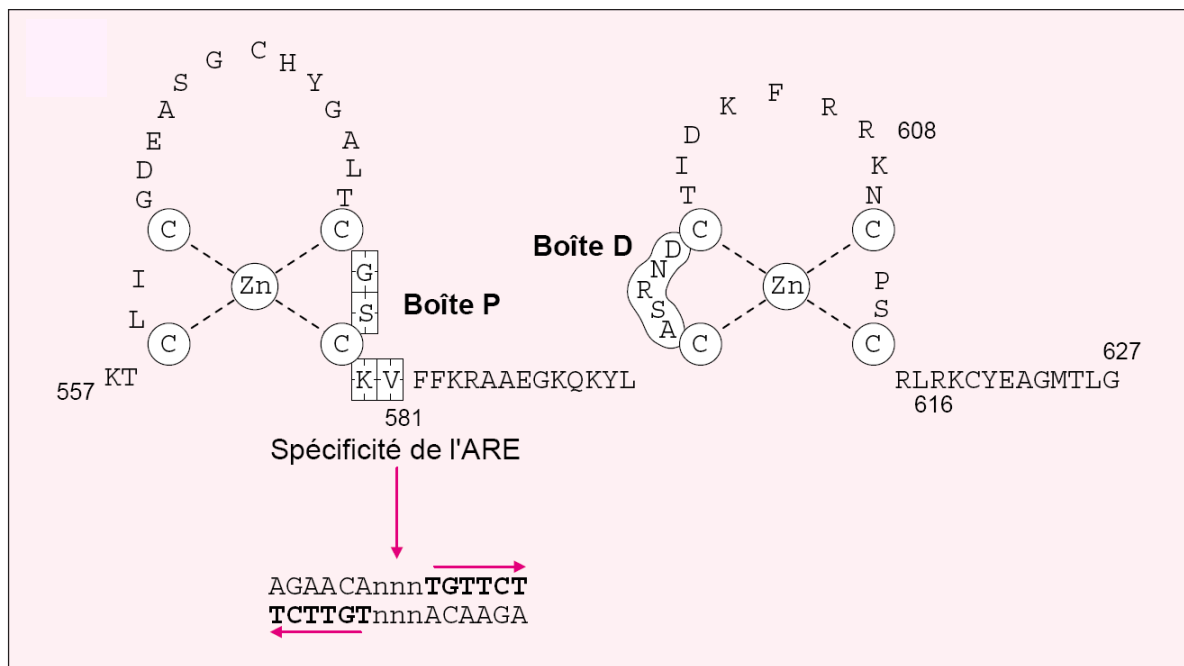


## 2. Structure du récepteur des androgènes.

Le récepteur des androgènes humain a été cloné en 1988 par plusieurs équipes (Chang et al., 1988; Lubahn et al., 1988; Trapman et al., 1988). Il est codé par une seule copie d'un gène d'environ 90 kb localisé sur le bras long du chromosome X dans la région Xq11-12 (*figure n°7*). Ce gène est composé de huit exons, dont le cadre de lecture ouvert s'étend sur 2,7 kb (*kilobase*), qui codent pour une protéine de 910 à 919 acides aminés. Ces variations de longueur tiennent au nombre variable des répétitions de triplets dans l'exon 1 qui codent pour des glutamines ou des glycines. Le poids moléculaire de la protéine est d'environ 110 kDa (*kilodalton*) (van Laar et al., 1989). Il faut également noter l'existence d'une isoforme minoritaire nommée A issue d'une initiation de traduction interne. Il en résulte une protéine de 87 kDa déléetée de sa partie N-terminale dont la fonction est encore mal connue (Gao and McPhaul, 1998; Wilson and McPhaul, 1994).

### a. Domaine transactivateur amino-terminal A/B.

Le domaine N-terminal du récepteur des androgènes codé par l'exon 1 représente plus de la moitié de la protéine. Il intervient de façon prédominante dans la régulation de la transcription grâce à deux zones fonctionnelles transactivatrices AF1 (*activating function 1*) et AF5 aussi nommées TAU1 ( $\tau 1$ ) et TAU5 ( $\tau 5$ ) (Jenster et al., 1995). Si l'activité du domaine AF1 est dépendante de la présence de l'hormone, celle de AF5 ne l'est pas (Brinkmann, 2001). L'interaction entre le domaine amino-terminal et le domaine de liaison du ligand carboxy-terminal est responsable de la conformation tridimensionnelle de la protéine qui lui confère sa stabilité et sa capacité transactivatrice maximale (Langley et al., 1995). Cette région comporte également de nombreux sites de phosphorylation dont les fonctions sont encore mal définies mais qui sont la cible de plusieurs voies de signalisation (Wang et al., 2004; Wen et al., 2000) et qui contribuent à l'activité de AR ou encore à la détermination de l'effet agoniste ou antagoniste d'un ligand (Wang et al., 1999). Enfin, ce domaine révèle également un polymorphisme au niveau de répétitions d'acides aminés glutamines (15 à 31 résidus répétés) et glycines (16 à 27 résidus répétés). Le nombre de ces répétitions semble crucial pour l'intégrité du récepteur puisqu'une extension anormalement longue de résidus glutamines est responsable d'une atrophie musculaire dégénérative nommée syndrome de Kennedy (Kennedy et al., 1968; La Spada et al., 1991). A l'inverse, un fragment poly-glycine ou poly-



**Figure n°8: Structure du domaine de liaison à l'ADN de AR.**

Le domaine de liaison à l'ADN de AR est organisé autour de deux doigts de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ). La boîte P est responsable de la reconnaissance et de la fixation aux éléments de réponse (ARE) et la boîte D est responsable de la dimérisation du récepteur. D'après Poujol et Sultan, 2000.

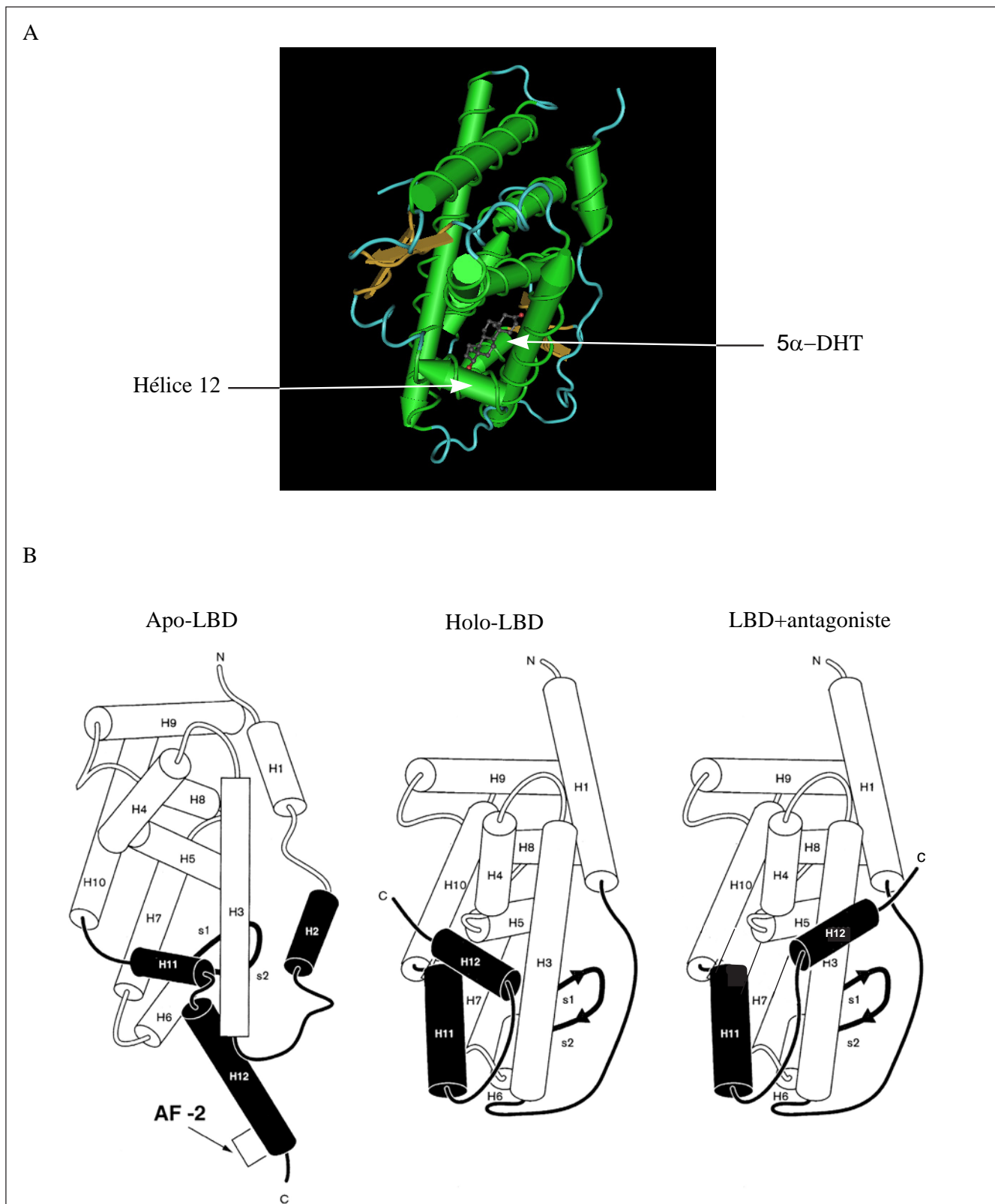
glutamine anormalement court est associé à une augmentation de la fonction de transactivation de AR et à une prédisposition au cancer de la prostate (Beilin et al., 2000; Giovannucci et al., 1997).

#### b. Domaine C de liaison à l'ADN.

Le domaine de liaison à l'ADN DBD (*DNA binding domain*) est codé par les exons 2 et 3. Il s'étend sur 66 à 68 acides aminés hautement conservés entre les différents récepteurs nucléaires. Au sein du DBD se trouvent deux anses protéiques, maintenues à leur base par quatre résidus cystéines et liées à leur base par un ion  $Zn^{++}$ , portant le nom de doigts de zinc (*figure n°8*). Le premier doigt porte une boîte P, dont la séquence en acides aminés est responsable de la spécificité de reconnaissance et de fixation à l'ADN (Zilliacus et al., 1995). Le second doigt porte la boîte D impliquée dans la dimérisation du récepteur ainsi que dans la stabilisation de l'interaction ADN-récepteur. Sous sa forme dimérique, le récepteur se lie à des séquences de l'ADN de type palindromique IR3 (*inverted repeat3*) que l'on nomme éléments de réponse aux androgènes ARE (*androgen response element*): 5'-GGA/TTACAnnnTGTTCT-3' (Roche et al., 1992). Le DBD de AR présente aussi une capacité de fixation à des AREs de type DR3 (*direct repeat 3*) (Schoenmakers et al., 2000). Ces derniers pourraient être responsables de la spécificité d'action des androgènes (Claessens et al., 2001). Les AREs sont retrouvés au niveau des séquences promotrices des gènes régulés par les androgènes, tels que le gène *PSA* (*prostate specific antigen*) chez l'homme, la *probasine* chez le rat et la souris ou *mvd/akr1b7* (*mouse vas deferens protein/aldoketoreductase b7*) chez la souris.

#### c. Région charnière D.

Ce domaine serait impliqué dans les changements conformationnels induits par la liaison du ligand et porteur d'un site de phosphorylation nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de AR (Zhou et al., 1995). De plus, ce domaine est porteur du signal de localisation nucléaire (NLS) du récepteur qui guide son transfert dans le noyau au travers des pores nucléaires (Zhou et al., 1994). Un rapport de Wang suggère que cette région exerce une régulation négative sur



**Figure n°9. Structure tridimensionnelle et mode de fonctionnement du domaine de liaison du ligand LBD de AR.**

**A.** Chrystallographie du domaine de liaison du ligand du récepteur des androgènes humain lié à la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone. Image Cn3D NCBI.

**B.** Représentation schématique des trois états conformationnels adoptés par un récepteur nucléaire: récepteur RXR en absence de son ligand (Apo-LBD), récepteur RAR (récepteur de l'acide rétinoïque) en présence de son ligand (Holo-LBD) et en présence d'un antagoniste. Cette dernière conformation masque la surface de liaison du récepteur à ses co-activateurs représentée par les hélices H3, H4 et H5. Modifié d'après Bourget et al. 2001 et Aranda et Pascual, 2001.

l'activité transcriptionnelle du domaine de transactivation AF2 situé dans le domaine de liaison du ligand (Wang et al., 2001a).

#### d. Domaine de liaison du ligand E/F.

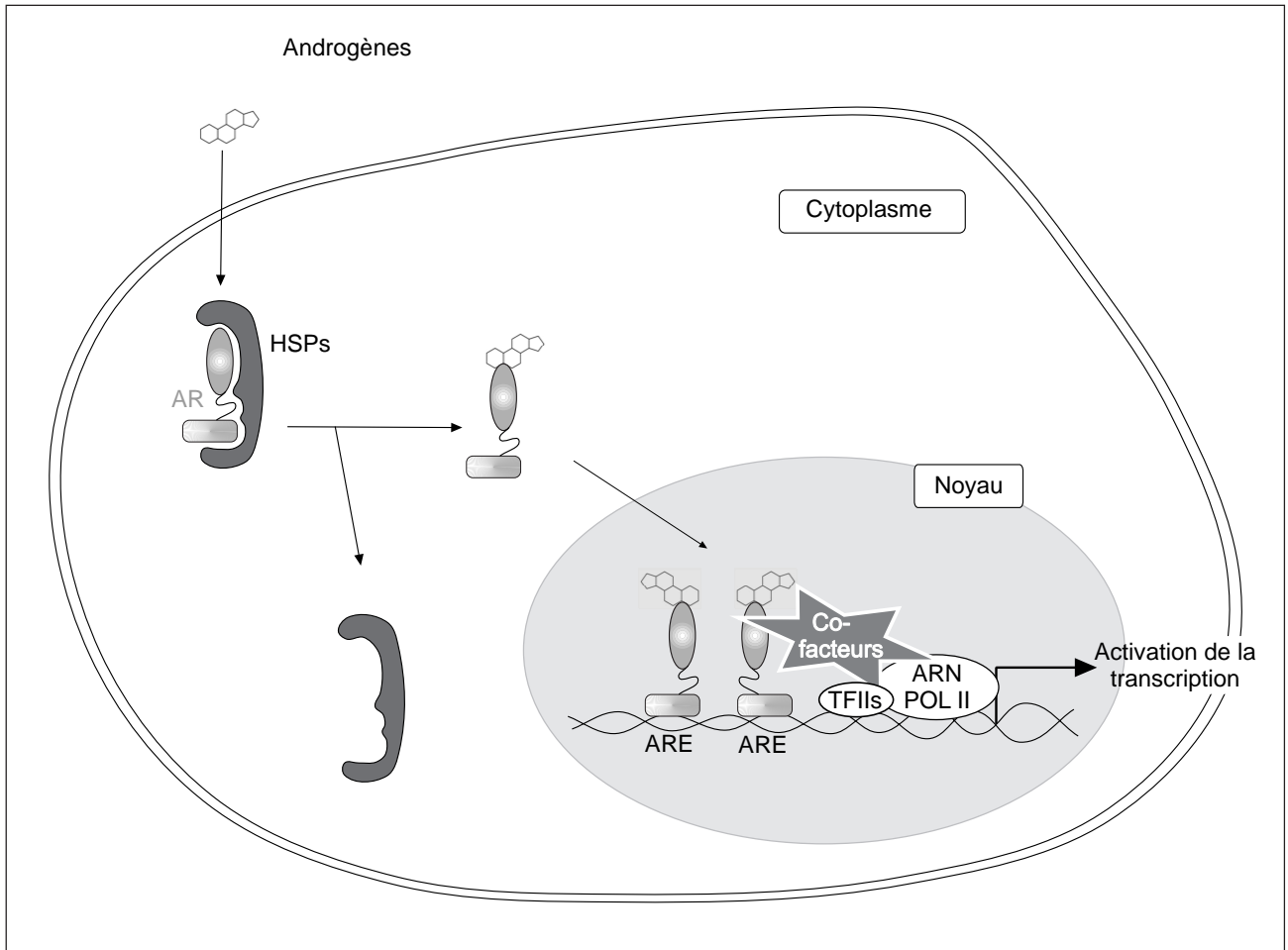
Le domaine de liaison du ligand (*LBD*, *ligand binding domain*) est codé par une partie de l'exon 4 et par les exons 5 à 8. Ce domaine est composé de douze hélices  $\alpha$  (H1 à H12) et d'un feuillet  $\beta$  (S1/S2) situé entre les hélices H5 et H6 (Matias et al., 2000) (*figure n°9*). Ces hélices délimitent une poche hydrophobe, composée des hélices H3, H5, H8, H11, H12 et du feuillet S1/S2, dans laquelle se fixe le ligand. La nature des acides aminés qui composent cette poche est spécifique et non conservée entre les différents récepteurs nucléaires, ce qui leur confère leur spécificité et la sélectivité de fixation du ligand. Le domaine carboxy-terminal possède un domaine de transactivation AF2 dont l'activité transcriptionnelle dépend de la conformation du récepteur induite par la liaison du ligand et du repliement de l'hélice H12. En effet, une fois l'hormone fixée au récepteur, l'hélice H12 se replie et vient refermer le ligand dans la poche. Ce mécanisme commun aux NRs a été étudié par Renaud grâce à la cristallisation du LBD du récepteur RAR $\gamma$  (*retinoic acid receptor  $\gamma$* ) (Renaud et al., 1995). Cette conformation autorise une surface d'interaction avec des protéines co-activatrices portant des motif LxxLL (L=*Leucine*) ou FxxLF (F=*Phenylalanine*) (Bourguet et al., 2000; Nolte et al., 1998). Tout ligand induisant un repliement différent de cette hélice pourrait ainsi empêcher le recrutement de co-activateurs et se comporterait alors comme un antagoniste (Shiau et al., 1998).

### C. Modes d'action des androgènes.

#### 1. Mode d'action génomique du récepteur des androgènes.

##### a. Fonctionnement général.

On qualifie de génomique le mode d'action du récepteur des androgènes lorsque ses effets directs l'impliquent en tant que facteur de transcription. Le processus qui conduit à



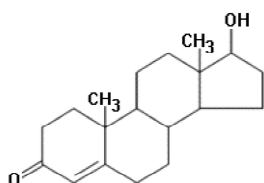
**Figure n°10: Mode d'action génomique du récepteur des androgènes.**

La fixation du ligand, testostérone ou DHT (dihydrotestostérone), libère le récepteur des androgènes des protéines chaperonnes HSPs. Il est alors importé dans le noyau où il se fixe aux séquences spécifiques ARE (*androgen response element*) en homo-dimère. Après recrutement des co-facteurs et de la machinerie transcriptionnelle de base, facteurs de transcriptions II (TFIIs) et ARN polymérase II, la transcription des gènes cibles de AR est activée.

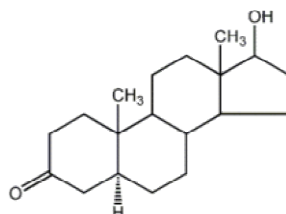
l'augmentation des niveaux d'expression des gènes cibles de AR se déroule en plusieurs étapes (**figure n°10**). En absence de liaison à son ligand, on admet classiquement que le récepteur des androgènes est localisé dans le cytosol (Georget et al., 1997; Tyagi et al., 2000) contrairement à d'autres récepteurs nucléaires tels que ER $\alpha$  ou PR-A qui sont localisés au niveau du noyau (Htun et al., 1999; Lim et al., 1999). De plus, le récepteur se trouve couplé à des protéines de choc thermique HSPs (*heat shock protein*) ainsi qu'à d'autres protéines associées qui jouent un rôle majeur de chaperones dans l'activité du récepteur. Ces protéines sont les HSP 90, HSP 70, des immunophilines telles que HSP56/FKBP52 et des co-chaperones de type HSP40 /Ydj1, Hop/p60 (*HSP organizer protein*), Hip/p48 (*hsc70 interacting protein*) ou encore p23 (Prescott and Coetzee, 2006). Ces protéines sont associées en un complexe appelé « foldosome » et vont intervenir à différents niveaux sur l'activité de AR. Les interactions entre AR et ces protéines sont transitoires et résultent de cycles d'association et de dissociation organisés autour de HSP90 (Pratt et al., 2004). Le premier rôle de ces chaperones est de maintenir AR sous une forme stable, partiellement non-repliée et qui lui confère une forte affinité pour son ligand (Fang et al., 1996). Les interactions entre ces différentes protéines et AR se font majoritairement avec le domaine de liaison de l'hormone. Une fois que le récepteur s'est lié à son ligand, il se détache du complexe HSP, ce qui démasque son signal de localisation nucléaire et le guide vers la membrane nucléaire. Il va alors pouvoir traverser cette dernière en passant au travers de pores nucléaires. Les protéines HSP70 pourraient jouer un rôle de dépliement-repliement qui faciliterait le transfert de AR à travers la membrane nucléaire (Rassow et al., 1995). D'autres protéines, les importines  $\alpha$  et  $\beta$  participent à la formation d'un complexe hétérotrimérique d'importation nucléaire en reconnaissant d'une part le NLS de AR et en jouant un rôle de pont entre ce dernier et le pore nucléaire. Il est à noter que le récepteur des androgènes subit un cycle d'import et d'export à travers la membrane nucléaire (Tyagi et al., 2000). En effet, AR se retrouve en majeure partie localisé dans le noyau seulement 60 minutes après une induction par son ligand, puis il retourne dans le cytoplasme après une privation androgénique et peut subir ce même cycle plusieurs fois après une nouvelle stimulation par l'hormone. Une fois dans le noyau, le récepteur se lie à l'ADN sous forme d'homodimère au niveau des séquences cibles ARE retrouvées au niveau des promoteurs des gènes cibles de AR. Il y a alors recrutement de l'ARN polymérase II, de la machinerie transcriptionnelle de base et de co-facteurs qui vont moduler les interactions au sein du complexe multi-protéique ou encore l'accessibilité à la chromatine. Une étude récente a permis de montrer que la liaison de AR à l'ADN ainsi qu'à des protéines de remodelage de la chromatine est dépendante de son interaction amino et

Androgènes naturels et synthétique.

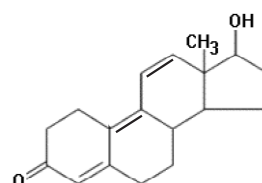
Testostérone



Dihydrotestostérone

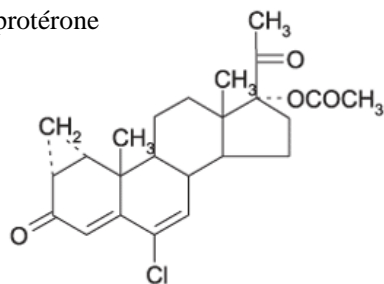


Méthyltrienolone,  
R1881

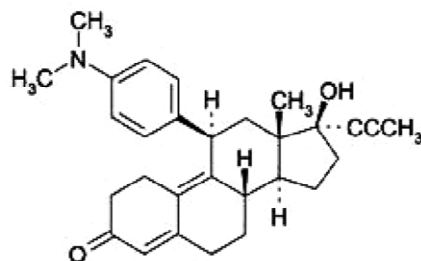


Anti-androgènes stéroïdiens.

Acétate de cyprotérone

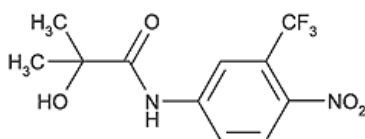


RU486

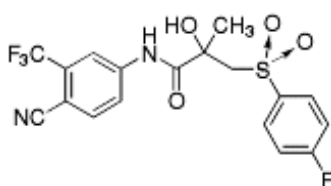


Anti-androgènes non-stéroïdiens.

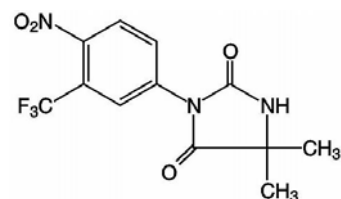
Hydroxy-flutamide



Bicalutamide



Nilutamide



**Figure n°11: Structures d'androgènes naturels et synthétiques, d'anti-androgènes stéroïdiens et non-stéroïdiens**



carboxy-terminale (interaction N/C) (Li et al., 2006). Les auteurs, à l'aide de lignées stables exprimant un AR muté qui empêche l'interaction N/C montrent que ce dernier n'est pas recruté au niveau de la séquence ARE située sur la région *enhancer* du gène *PSA* endogène. De plus, ce mutant présente un défaut de liaison aux protéines de remodelage de la chromatine SWI/SNF (*switch/sucrose nonfermenting*). Cette interaction N/C semble aussi être impliquée dans la stabilisation du récepteur induite par la fixation de son ligand ainsi que dans une compétition pour le recrutement de co-activateurs tels que ceux de la famille p160 (He and Wilson, 2002). En effet, elle implique des domaines de type FxxLF et WxxLF (L=leucine, F=Phénylalanine, W=Tryptophane) situés dans le domaine amino-terminal et qui présentent une plus forte affinité pour le domaine de transactivation AF2 que pour les co-activateurs (He et al., 2001).

#### b. Les anti-androgènes.

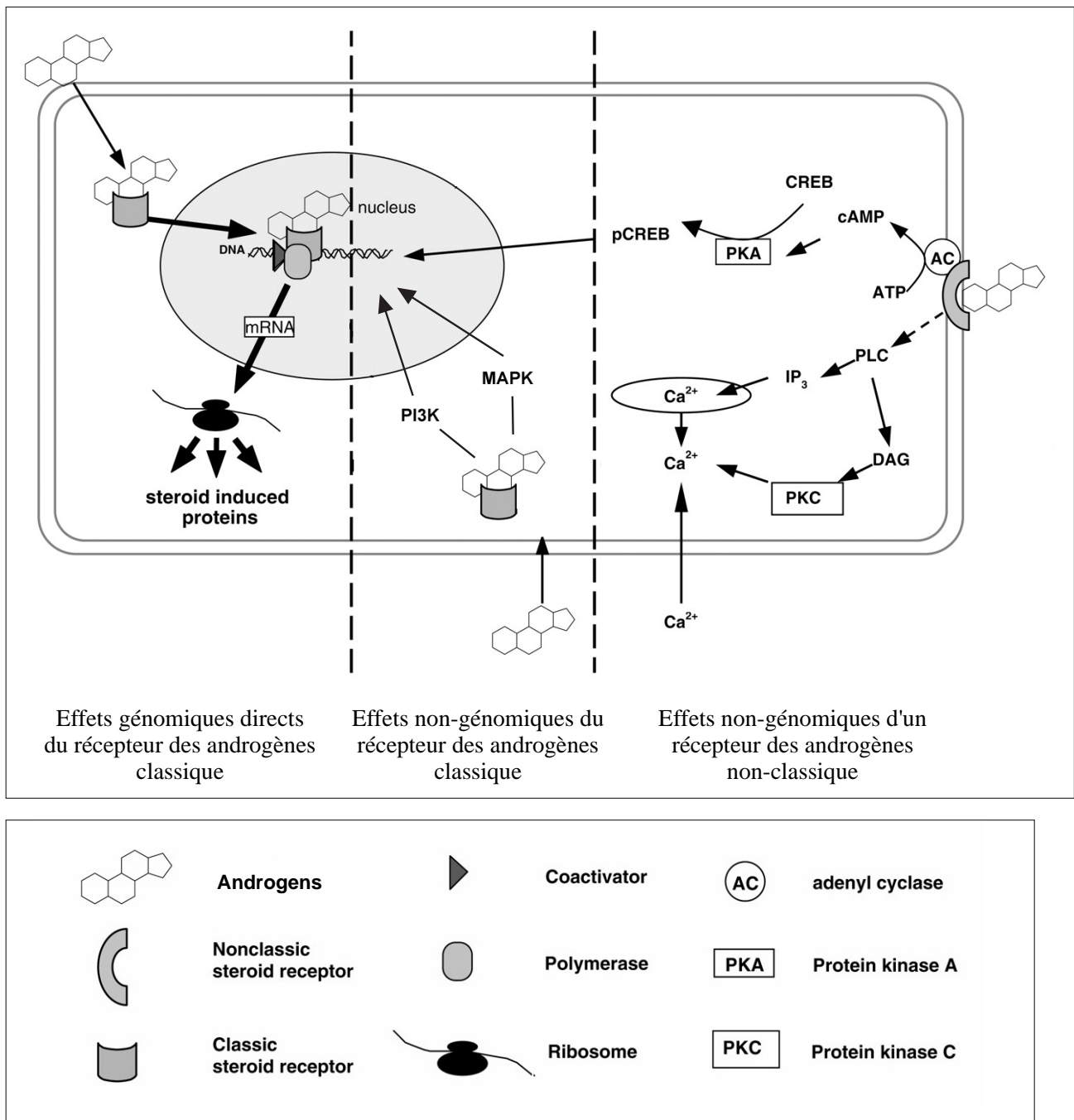
Les anti-androgènes sont des ligands synthétiques qui interfèrent avec l'effet biologique des androgènes en s'opposant aux mécanismes classiques d'activation de AR que nous venons de décrire. Ces anti-androgènes sont de deux types : les anti-androgènes stéroïdiens tels que l'acétate de cyprotérone (CPA) ou le RU486 (Mifepristone) et des anti-androgènes non-stéroïdiens comme le flutamide (ou son métabolite actif l'hydroxy-flutamide), le bicalutamide (ICI 176334 ou Casodex) ou encore le Nilutamide (RU23908 ou Anandron) (*figure n°11*). Ces anti-androgènes sont utilisés en clinique pour le traitement de nombreuses pathologies ou affections associées aux androgènes : acné, alopecie, hirsutisme et surtout cancer de la prostate dans le stade hormono-dépendant (Blackledge et al., 1997; Dole and Holdsworth, 1997; Raynaud et al., 1984). Le CPA, le RU486 et dans une moindre mesure l'hydroxy-flutamide présentent des effets antagonistes et agonistes partiels sur l'activité transcriptionnelle de AR : on ne les considère pas comme des anti-androgènes purs. A l'inverse, les anti-androgènes non-stéroïdiens (Nilutamide et bicalutamide) sont des anti-androgènes purs. Un premier mode d'action par lequel les anti-androgènes peuvent moduler l'activité de AR est leur capacité à s'opposer au transfert du récepteur dans le noyau. En effet, les anti-androgènes tels que le bicalutamide ou le nilutamide ralentissent considérablement le passage de AR du cytoplasme vers le noyau (Georget et al., 2002). Le bicalutamide augmente de plus le taux de renouvellement du récepteur (Waller et al., 2000) et régule négativement son niveau de phosphorylation (Wang et al., 1999). Les anti-androgènes peuvent également



s'opposer à la liaison de AR à l'ADN ; c'est notamment le cas de l'hydroxy-flutamide ou du nilutamide (Kuyl and Mulder, 1996). Si le bicalutamide ou le RU486 n'empêchent pas la liaison de AR à ses séquences cibles sur l'ADN, ils s'opposent à l'interaction N/C du récepteur (Masiello et al., 2002; Song et al., 2004). Il en résulte ainsi un complexe passif sans activité transcriptionnelle. Enfin, il a été montré que les anti-androgènes induisent un repliement différent du domaine de liaison de l'hormone qui se traduit par une conformation différente du récepteur. Ce dernier va alors présenter des affinités moindres pour des protéines co-activatrices ou co-repressives. Ainsi, l'hydroxy-flutamide ou le bicalutamide s'opposent au recrutement de GRIP1 (*glucocorticoid receptor-interacting protein 1*) par AR et à leur colocalisation dans le noyau (Karvonen et al., 2002). Une autre étude plus récente met en évidence un défaut de recrutement de p300 et de GRIP1 sur le promoteur du gène *PSA* et au contraire une très forte présence des co-represseurs N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) et SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*) sur ces mêmes éléments en réponse au bicalutamide (Kang et al., 2004b). Ceci résulte en un défaut d'acétylation de la queue des histones H3 au niveau de la région promotrice du gène *PSA*, aboutissant à une moindre ouverture de la chromatine. Un recrutement excessif de N-CoR et SMRT se fait également en réponse à l'acétate de cyprotérone ou à la mifépristone au niveau du promoteur. Ainsi, si les modes d'action des anti-androgènes sont multiples, il résulte de leur présence une régulation négative de l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes.

## 2. Mode d'action non-génomique.

Les hormones stéroïdes agissent classiquement par l'intermédiaire de leur récepteur qui joue son rôle de facteur de transcription au niveau de l'ADN comme nous venons de le décrire. Ces processus qui font intervenir les mécanismes de transcription et de traduction nécessitent un délai minimum de une à plusieurs heures pour être mis en place. Néanmoins, il est désormais clairement admis que ces hormones ont la capacité d'induire des réponses cellulaires dans un délai très court de quelques secondes à quelques minutes. Ces effets sont qualifiés de non-transcriptionnels ou non-génomiques. Ils impliquent la mobilisation rapide de seconds messagers tels que le  $\text{Ca}^{2+}$ , l'IP3 (*inositol triphosphate*), le DAG (*diacylglycerol*) et l'activation de voies de signalisation par l'intermédiaire de la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la voie des MAPKinases (*mitogen activated kinase*) ou de la



**Figure n°12: Différents modes d'action du récepteur des androgènes.**

En plus de la voie dite génomique, le récepteur des androgènes peut initier des effets rapides non-génomiques par l'activation de voies alternes. Le récepteur cytosolique classique peut en effet activer des voies de signalisation telles que celle de la PI3K (phosphoinositid-3-OH kinase) ou celle des MAPK (mitogen activated kinase). De plus, les androgènes peuvent aussi induire la mobilisation du calcium intra-cellulaire ainsi que l'activation de l'adénylate cyclase en se liant à un récepteur membranaire différent de leur récepteur classique. PLC, phospholipase C; DAG, diacylglycérol; IP3, inositol triphosphate. Modifié d'après Losèl et al., 2003.

PI3Kinase (*phosphoinositid-3-OH kinase*) (Falkenstein et al., 2000; Losel et al., 2003). Ces effets non-génomiques semblent adopter divers modes d'action impliquant ou non le récepteur des androgènes (*figure n°12*).

Le premier mode d'action par lequel pourraient agir les androgènes serait par leur intégration à la membrane cellulaire et le contrôle d'ATPases (*ATP : adenosine triphosphate*) membranaires tel que cela a été proposé pour le 17 $\beta$ -estradiol (Whiting et al., 2000).

Il a également été suggéré que les androgènes puissent agir via un récepteur membranaire. L'activation de ce dernier par la liaison à l'hormone pourrait moduler l'activité de canaux calcium ainsi que la mobilisation calcique intra-cellulaire. Ainsi, l'addition de testostérone-BSA (*bovine serum albumine*) qui ne peut pénétrer rapidement à travers la membrane plasmique entraîne une modulation rapide de la concentration intra-cellulaire de Ca<sup>2+</sup> dans des cellules T et des macrophages IC-21 (Benten et al., 1999a; Benten et al., 1999b). Les mécanismes d'influx du calcium dans ces deux types cellulaires sont légèrement différents avec une libération de Ca<sup>2+</sup> provenant des stocks intra-cellulaires pour les cellules IC-21 et un influx trans-membranaire pour les cellules T. Néanmoins, les cellules IC-21 ne possèdent pas de récepteur des androgènes classique, celui des cellules T est incapable de transloquer dans le noyau, et la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intra-cellulaire est insensible aux anti-androgènes. En revanche, l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> induite par la testostérone est inhibée par la toxine de pertussis suggérant l'implication d'un récepteur couplé aux protéines G dans la transduction du signal. Des mécanismes similaires d'influx de Ca<sup>2+</sup> ont aussi été démontrés dans des cellules de Sertoli (Lyng et al., 2000) et des cellules LNCaP (Steinsapir et al., 1991) bien qu'ils soient sensibles à certains anti-androgènes. Il a été suggéré que le récepteur couplé aux protéines G modulant ces effets soit le récepteur du SHBG (*sex hormone binding globulin*) dont la mobilisation induite par fixation de l'hormone activerait la PKA modulant ainsi le niveau de phosphorylation de AR (Heinlein and Chang, 2002). Néanmoins, le débat concernant un récepteur des androgènes membranaire reste ouvert.

Enfin, les androgènes peuvent initier des effets non-génomiques par l'intermédiaire de leur récepteur classique en interagissant avec des voies de signalisation cellulaires. Ceci a notamment été démontré dans des cellules tumorales prostatiques LNCaP et PC3 stablement transfectées avec AR (Peterziel et al., 1999). En effet le traitement de ces cellules avec de la DHT induit une activation rapide et transitoire des MAPK résultant en une phosphorylation des kinases erk1 et erk2 et une activation du facteur de transcription elk-1. Cette activation serait de plus dépendante de l'action des voies PI3K et PKC. Une telle activation de la voie MAPK et d'un autre facteur de transcription, CREB (*cAMP response element binding*



*protein*), a été mise en évidence dans des cellules de Sertoli et est proposée comme un mécanisme régulateur de la spermatogenèse (Fix et al., 2004). L'activation de la voie PI3K par les androgènes impliquant le récepteur conventionnel a été étudiée dans plusieurs systèmes cellulaires notamment dans des ostéoblastes (Kang et al., 2004a), des cellules tumorales prostatiques (Baron et al., 2004; Sun et al., 2003) ainsi que dans des cellules épithéliales saines (Baron et al., 2004). Dans celles-ci, le récepteur des androgènes interagit avec la sous-unité p85 $\alpha$  de la PI3K, ce qui active la protéine kinase Akt et le facteur de transcription aval FKHRL1 (*forkead in rhabdomyosarcoma L1*) et inhibe le facteur pro-apoptotic Bad. Ces différents événements impliquent les androgènes dans la survie cellulaire et la protection contre l'apoptose par des mécanismes jusqu' alors inexplorés.

Si les preuves de l'existence de voies non-génomiques initiées par les androgènes ne sont plus à faire, les mécanismes d'action semblent encore très complexes et multiples. On suppose que ces effets permettraient l'adaptation rapide d'une cellule à des changements environnementaux. Néanmoins, ils peuvent aussi avoir pour cibles des facteurs de transcription et leurs partenaires transcriptionnels et ainsi influencer le profil du transcriptome de la cellule (Kousteni et al., 2003). Il semble donc qu'il existe au sein des cellules une collaboration et des inter-connexions complexes entre les effets non-génomiques et les effets transcriptionnels pour contrôler l'homéostasie cellulaire.





## **II. Modulation de l'activité du récepteur des androgènes par son interaction avec des protéines co-régulatrices.**

Si le récepteur des androgènes est l'acteur principal des vastes effets physiologiques que nous venons de décrire de façon non-exhaustive, son action est sans cesse épaulée et modulée par son interaction avec d'autres protéines. En effet, que ce soit dans le compartiment cytosolique ou nucléaire, le récepteur se trouve couplé à des partenaires que l'on appelle des co-régulateurs. Ces derniers sont essentiels aux propriétés fonctionnelles de AR telle que sa stabilité, son affinité pour le ligand, sa translocation nucléaire, son affinité pour l'ADN ou encore sa capacité à recruter la machinerie transcriptionnelle. De plus, de par leur interaction transitoire, leur activité inductible ou encore leur tissu-spécificité, ils permettent une réponse adaptative et spécifique de la cellule ou de l'organe aux androgènes. On décrit deux types de co-régulateurs : les co-activateurs qui exercent une action positive sur la transactivation par AR et les co-represseurs qui au contraire jouent une action négative sur son activité transcriptionnelle.

Dans ce chapitre, nous allons décrire certains co-régulateurs du récepteur des androgènes en nous basant sur leur mécanisme d'action. Nous appréhenderons d'une part les protéines qui jouent un rôle sur la stabilité du récepteur, sa disponibilité ou sa distribution intra-cellulaire, ce qui se traduit au final par une modulation de son activité. D'autre part, nous étudierons les protéines avec lesquelles interagit AR et qui régulent le recrutement des facteurs généraux de la transcription, le remodelage de la chromatine ou l'occupation de l'ADN sur le promoteur des gènes cibles du récepteur. Enfin nous envisagerons la modulation de l'activité de AR par son interaction avec des protéines du cycle ou de la signalisation cellulaire.

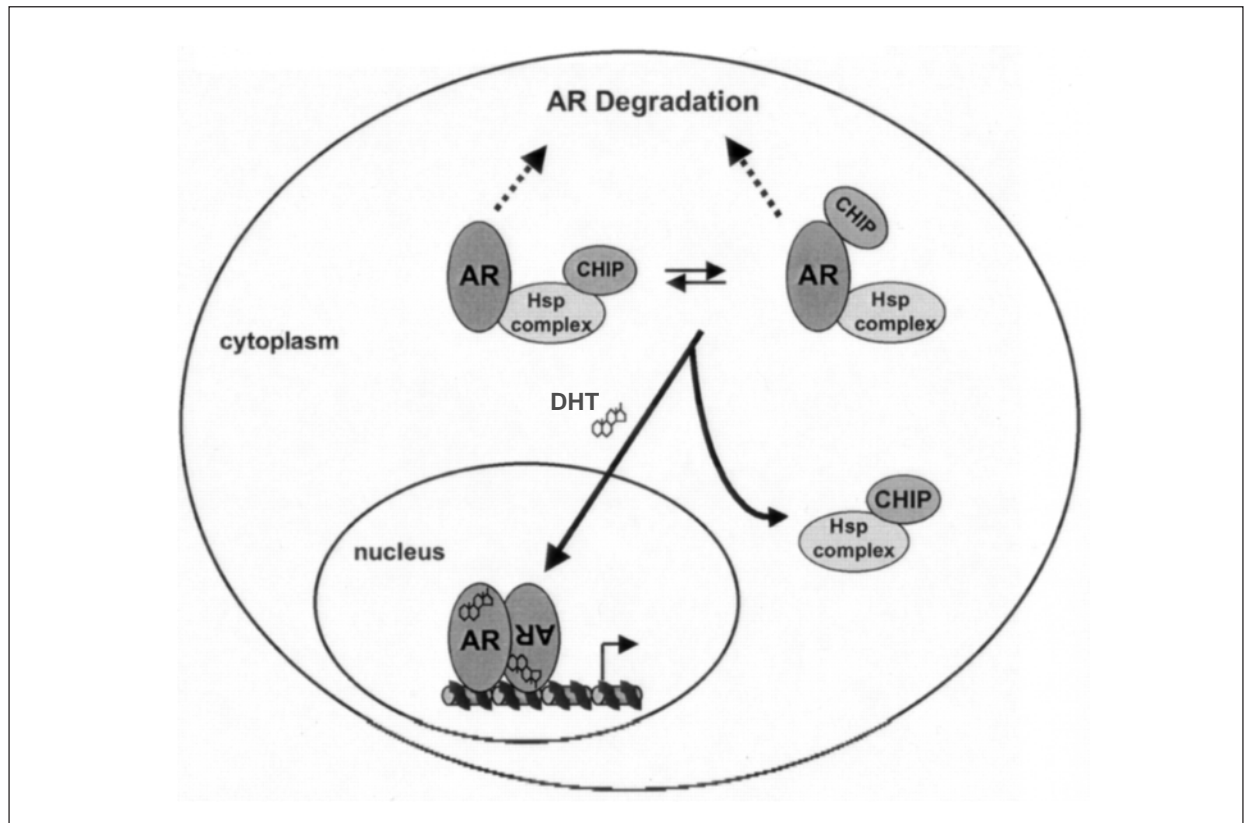


## **A. Interactions protéiques modulant la stabilité et la localisation du récepteur des androgènes.**

### **1. Modulation de la stabilité et du niveau d'accumulation de AR par des protéines co-régulatrices.**

#### **➤ La protéine chaperonne HSP90.**

Un acteur majeur de la stabilité cytoplasmique de AR est la protéine HSP90. En effet, l'action des protéines de choc thermique sur l'activité des récepteurs nucléaires a largement été étudiée (Heinlein and Chang, 2001; Pratt, 1997; Pratt et al., 2004). S'il ressort de ces études un mode d'action général des HSPs, il semble également que leur effet sur l'affinité des récepteurs à leur ligand, la modulation de leur structure, leur transfert dans le noyau ou encore leur stabilité soit spécifique de chacun des récepteurs. Ainsi, la stabilité des récepteurs stéroïdiens a souvent été assimilée à la conformation imprimée par les HSPs et notamment HSP90 pour les maintenir dans le cytoplasme sous une forme possédant une forte affinité pour leur ligand (Hayes and Dice, 1996). En ce qui concerne l'affinité de AR pour son ligand, plusieurs rapports font état de résultats controversés. Une étude de Nemoto et coll. suggère que HSP90 n'est pas nécessaire à la fixation des androgènes à AR (Nemoto et al., 1992). Un autre rapport montre que la geldanamycine, qui inhibe HSP90, ne réduit que de 33% l'affinité de AR pour son ligand contre une inhibition totale pour les récepteurs PR ou ER (Segnitz and Gehring, 1997). Enfin une dernière étude plus récente réalisée dans des cellules tumorales de prostate LNCaP révèle une inhibition de la fixation de AR à son ligand en présence de geldanamycine (Vanaja et al., 2002). Les différences de résultats peuvent être expliquées par les différents systèmes (levure, cellules humaines, lysats de réticulocytes) ou encore les protocoles utilisés (température, AR pleine longueur ou tronqué). De plus, l'étude de Vanaja et coll. établit une corrélation entre le traitement des cellules avec de la geldanamycine et la perte des fonctions du récepteur des androgènes. En effet, les auteurs mettent en évidence une diminution de l'accumulation de AR en raison d'une demie-vie plus courte dans des cellules traitées avec l'inhibiteur de HSP90. Cette déstabilisation de AR se traduit par une diminution de son activité transcriptionnelle sur le gène cible endogène *PSA*. Ces derniers travaux placent ainsi clairement HSP90 comme un acteur clef régulant la stabilité de AR.



**Figure n°13: Model de fonctionnement du ciblage de la dégradation de AR par la protéine CHIP et les HSPs.**

En absence de son ligand, le récepteur des androgènes interagit avec les protéines chaperonnes HSPs et/ou avec la protéine CHIP (Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) qui induisent ainsi sa dégradation par la voie du protéasome et son recyclage. L'hormone induit une translocation du récepteur dans le noyau et le protège de sa dégradation. HSP, heat shock protein. D'après He et al., 2004.

La protéine CHIP (*carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*) est une co-chaperone que l'on retrouve associée à HSP70 mais qui interagit aussi avec HSP90 par l'intermédiaire d'un domaine TPR (*tetratricopeptide repeat*). Cette protéine est, en outre, impliquée dans la dégradation des protéines interagissant avec des chaperonnes moléculaires tel que GR (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001). Cette propriété semble être conférée par son activité E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation par le protéasome (Jiang et al., 2001) et appliquée aux protéines dont le repliement est incorrect (Murata et al., 2001). Un rapport récent met en évidence l'interaction entre CHIP et un domaine très conservé de la portion amino-terminale du récepteur des androgènes (He et al., 2004). Les auteurs démontrent un effet inhibiteur de CHIP sur l'accumulation de AR en l'absence d'hormone et une diminution de l'effet stabilisateur de la DHT sur l'accumulation de AR. Ces événements se traduisent par une inhibition de l'activité transcriptionnelle de AR. De plus, cette étude implique clairement l'intervention de HSP90 dans cet effet puisqu'un mutant de délétion de CHIP qui ne porte plus son domaine TPR, n'influence pas le niveau d'accumulation de AR. Les auteurs font l'hypothèse que CHIP pourrait interagir avec les HSP et AR dans le cytoplasme et cibler sa dégradation jusqu'à la fixation du récepteur à son ligand. Ce mode d'action permettrait un recyclage du récepteur lorsque celui-ci n'est pas lié à son ligand (**figure n°13**). Une autre étude réalisée sur le rôle de CHIP dans la régulation de la stabilité de AR a mis en évidence une ubiquitinylation de AR par CHIP *in-vivo* (Cardozo et al., 2003). Une surexpression de CHIP s'accompagne d'une forte diminution du niveau d'accumulation de AR en absence et en présence de son ligand, mais cet effet n'est que partiellement renversé en présence d'un inhibiteur du protéasome. Ceci suggère que d'autres mécanismes sont mis en place par CHIP pour réguler le niveau protéique de AR. Un de ces mécanismes est un effet inhibiteur sur la synthèse de AR. De plus, cette étude montre un effet de CHIP indépendant de HSP90. Ainsi, les auteurs font l'hypothèse que CHIP préviendrait plutôt l'action de HSP70 dans le repliement adéquat du récepteur des androgènes. Si ces deux rapports présentent des divergences quant au médiateur de l'action de CHIP, ils lui confèrent néanmoins un rôle de protéine régulatrice de la disponibilité de AR en absence mais aussi en présence de son ligand.

➤ Le suppresseur de tumeur PTEN.

Un autre co-facteur de AR qui module sa stabilité et son niveau d'accumulation est le suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*)



retrouvé très fréquemment muté dans de nombreux cancers. Par exemple, la perte de l'expression de PTEN est souvent rencontrée dans des lignées de tumeurs cancéreuses prostatiques (Vlietstra et al., 1998) et des souris hétérozygotes pour une version mutée de PTEN développent des hyperplasies et dysplasies épithéliales prostatiques (Di Cristofano et al., 1998). De plus, la perte d'un allèle de PTEN associée à une invalidation du gène codant pour le CKI (*cyclin dependant kinase inhibitor*) p27<sup>Kip1</sup> chez la souris, conduit au développement de carcinomes prostatiques (Di Cristofano et al., 2001). La protéine PTEN présente une interaction avec le facteur de transcription p53 et régule sa stabilité et son activité transcriptionnelle (Freeman et al., 2003). Aussi, connaissant l'implication des androgènes dans la pathologie prostatique, une équipe s'est intéressée à la régulation de la fonction de AR par PTEN (Lin et al., 2004b). Leurs résultats mettent en évidence une interaction *in-vitro* directe entre PTEN et AR mais aussi leur interaction *in-vivo* dans des cellules tumorales prostatiques LNCaP. De plus, cette interaction se traduit par une prévention de la translocation de AR dans le noyau en réponse à la DHT et une diminution de sa demi-vie. En effet, une surexpression de PTEN réduit la demi-vie d'un AR exogène de 2,5 à 0,5 heures en présence de DHT dans des cellules COS-1 et de 4 heures à 1 heure pour le récepteur endogène de cellules LNCaP. Il faut noter que dans des cellules à faible passage, cet effet est indépendant de la voie PI3K/Akt (*phosphoinositid-3-OH kinase/ murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog/PKB*) en partie contrôlée par PTEN. Cette dernière est néanmoins connue pour réguler l'expression de AR dans des cellules épithéliales saines et des cellules tumorales (Manin et al., 2002). De plus, les auteurs démontrent que cette diminution du niveau de AR ne passe pas par une dégradation par le protéasome et se traduit par une perte de la transcription dépendante des androgènes. Enfin, l'induction de l'apoptose de cellules surexprimant PTEN semble être induite en partie par son interaction directe et son effet inhibiteur sur l'activité de AR.

Ainsi, les protéines chaperonnes et co-chaperonnes mais aussi des protéines de signalisation cellulaires telles que PTEN sont des acteurs majeurs de régulation de la stabilité et du niveau d'accumulation du récepteur des androgènes. Leur interaction et leur action sur le récepteur se traduit par une modulation de sa disponibilité, de sa capacité à activer des gènes cibles et à mettre en place les réponses cellulaires physiologiques adaptées aux signaux environnementaux.





## 2. Modulation de la localisation de AR par des protéines co-régulatrices.

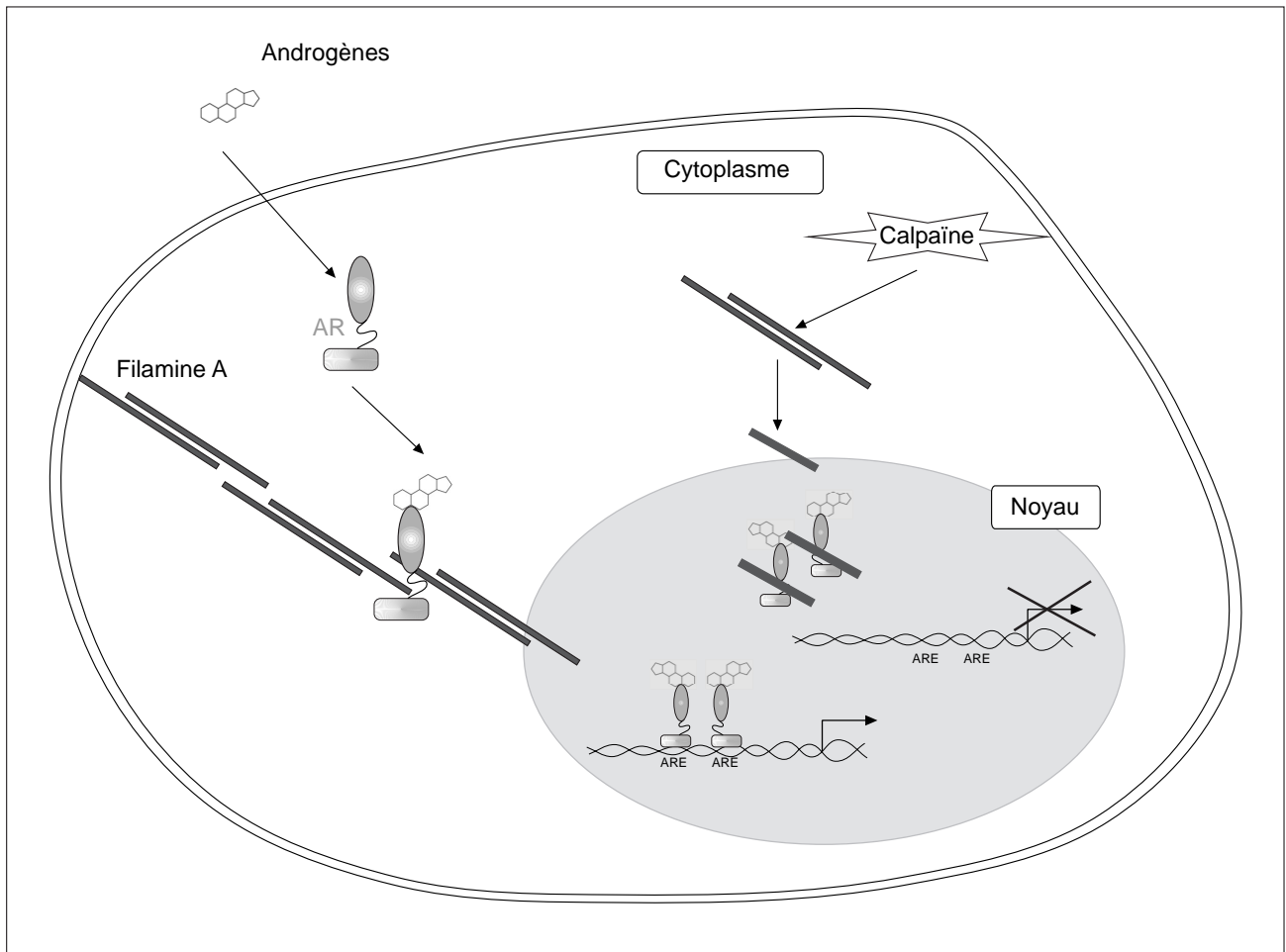
Une autre voie par laquelle l'activité de AR peut être modulée est par son interaction avec des protéines qui vont faciliter ou au contraire empêcher sa translocation dans le noyau après sa liaison à l'hormone, favorisant ou non sa disponibilité nucléaire. Dans ce paragraphe nous étudierons quelques exemples de chacun de ces deux types de protéines.

### a. Protéines facilitant le transfert cytoplasme-noyau de AR.

Le transfert du cytoplasme vers le noyau de AR, aiguillé par son signal de localisation nucléaire, semble être dépendant de son interaction avec d'autres protéines, en particulier avec la filamine A mais aussi avec certaines HSPs.

#### ➤ La filamine A.

Dans un crible d'interaction double-hybride chez la levure impliquant le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison à l'hormone de AR comme appât, Ozanne et coll. ont identifié une protéine du cytosquelette liée à l'actine : la filamine A (Ozanne et al., 2000). Chez les Mammifères, il existe trois isoformes de filamine : A, B, C. Ces protéines, localisées dans le cytoplasme, participent à la formation du cytosquelette cellulaire sous forme d'homodimère et par leur interaction avec l'actine grâce à un domaine de liaison situé dans leur partie amino-terminale. Si le cytosquelette est essentiel pour le maintien de la structure et de la mobilité cellulaire, il est de plus en plus évident que les protéines qui le composent participent aussi à l'intégration des signaux cellulaires. Ozanne et coll. ont mis en évidence une interaction *in-vitro* entre les deux protéines impliquant nécessairement les domaines DBD et LBD de AR. Cette interaction est indépendante du ligand bien que renforcée par ce dernier. De façon intéressante, dans des cellules déficientes en filamine, la localisation de AR est cytoplasmique en absence et en présence de ligand et il en résulte une absence d'activité transcriptionnelle de AR. Une transfection stable de filamine dans ces cellules restaure la localisation nucléaire classique de AR en réponse à l'hormone et son activité transcriptionnelle. De plus, une construction délétante de AR pour sa partie amino-terminale, et décrite comme étant constitutivement nucléaire même en absence de ligand (Simental et al., 1991), présente aussi



**Figure n°14: La filamine A est un co-régulateur du récepteur des androgènes.**

Protéine du cytosquelette liée à l'actine, la filamine A interagit avec le récepteur des androgènes ce qui induit sa translocation nucléaire. Néanmoins, le clivage protéolytique de la filamine par la calpaïne libère un fragment peptidique correspondant à l'extrémité amino-terminale de la filamine. Ce dernier interagit avec AR dans le noyau et inhibe son activité transcriptionnelle en s'opposant à l'interaction N/C de AR et au recrutement de co-activateurs.

une distribution cytoplasmique dans les cellules déficientes en filamine. La restauration de la filamine par transfection redonne au AR mutant un profil nucléaire constitutif. Plus récemment d'autres auteurs ont également identifié la filamine A comme protéine interagissant avec le domaine charnière (Hinge) de AR (Loy et al., 2003). Les auteurs mettent en évidence un effet inhibiteur de la filamine A sur l'activité transcriptionnelle de AR qu'ils expliquent par un effet négatif sur l'interaction N/C de AR et sur le recrutement de co-facteurs tels que TIF-2 (*transcription intermediary factor 2*). Ils impliquent la filamine dans ces deux événements nucléaires en démontrant la localisation nucléaire d'un fragment carboxy-terminal de la filamine A qui pourrait être généré par un clivage protéolytique par la calpaïne. Enfin ils démontrent que cette portion seule de la filamine A est suffisante pour conduire l'effet inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle de AR. La filamine A se comporte donc comme un co-régulateur de AR et semble jouer un double rôle en favorisant d'une part le transfert du récepteur dans le compartiment nucléaire et d'autre part, en modulant son activité nucléaire (*figure n°14*).

➤ La protéine chaperonne HSP 90.

Nous avons vu précédemment que les molécules chaperonnes HSPs jouaient un rôle primordial pour le maintien du récepteur sous une forme stable lui permettant d'adopter une conformation adéquate pour la liaison de son ligand. Plusieurs rapports montrent l'implication de ces molécules et notamment de HSP90 dans le transfert du récepteur dans le noyau. En effet en 2002, l'étude de Georget et coll. concernant le rôle de HSP90 sur l'activité de AR en présence d'agonistes ou d'antagonistes, a permis de mettre en évidence son rôle clef dans la translocation de AR dans le noyau (Georget et al., 2002). L'incubation de cellules avec de la geldanamycine inhibe la translocation de AR même si ce dernier a préalablement été incubé avec son ligand. Des expériences d'immuno-fluorescence révèlent une distribution cytoplasmique de AR avec formation d'agrégats. On aurait pu faire l'hypothèse que la geldanamycine empêche la modulation de AR nécessaire à l'obtention d'une conformation active et adéquate à son transfert. Néanmoins, l'étude du profil de dégradation de AR par la trypsine permet de révéler un fragment de 25 kDa résistant à la digestion et correspondant à la même forme que celle obtenue après digestion du récepteur en présence de son agoniste seul. Une étude plus récente utilisant un autre inhibiteur de HSP90, conduit aux mêmes résultats avec un défaut de translocation nucléaire et la formation d'agrégats cytoplasmiques (Thomas et al., 2004).



b. Protéines inhibant le transfert cytoplasme-noyau de AR.

➤ Le récepteur orphelin DAX-1.

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle clef du récepteur orphelin DAX-1 dans la régulation de l'activité d'autres récepteurs nucléaires tel que SF1 (Ito et al., 1997) ou encore les deux isoformes du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Zhang et al., 2000a). Les mécanismes d'action de DAX-1 sur ces récepteurs nucléaires sont supposés de deux types. Il semble que DAX-1 puisse masquer le domaine d'interaction induit par la fixation du ligand avec des co-activateurs mais aussi recruter des co-represseurs tels que N-CoR. L'invalidation *in-vivo* de DAX-1 chez la souris souligne son rôle capital dans le développement et le maintien des fonctions reproductrices mâles (Wang et al., 2001b; Yu et al., 1998). Aussi, certains auteurs se sont intéressés à son rôle potentiel sur la régulation de l'activité de AR. Les auteurs ont ainsi mis en évidence une interaction entre les deux protéines, indépendante du ligand bien qu'impliquant le domaine LBD de AR, et un effet inhibiteur de DAX-1 sur l'activité transcriptionnelle de AR dans des cellules de mammifères COS-7 (Holter et al., 2002). Dans le but de caractériser le mode d'action de DAX-1 sur l'activité de AR, il a été montré que la surexpression de DAX-1 résulte en une distribution cytoplasmique de AR en absence mais surtout en présence d'hormone. Ceci suggère un effet inhibiteur de DAX-1 sur la translocation nucléaire de AR par séquestration de ce dernier dans le cytoplasme et ceci, en absence ou en présence de DHT. Une des hypothèses émise serait un masquage du NLS de AR par la liaison de DAX-1. En outre, il est possible que DAX-1 soit aussi impliqué dans le transport rétrograde de AR vers le cytoplasme. Une autre étude se basant sur les niveaux et les compartiments d'expression de DAX-1, AR, ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans différents types de carcinomes mammaires a également permis de mettre en évidence une corrélation entre le niveau d'accumulation de DAX-1 et la localisation cytoplasmique de AR (Conde et al., 2004). De plus, la fraction nucléaire minoritaire de DAX-1 et son effet inhibiteur sur l'interaction N/C de AR laisse également supposer qu'il joue un rôle supplémentaire de co-répresseur nucléaire.

➤ Le co-régulateur ARA 67.

En criblant une banque d'ADNc de prostate humaine à l'aide d'un appât correspondant à la région N-terminale de AR (acides aminés 1 à 537) par une technique de double-hybride

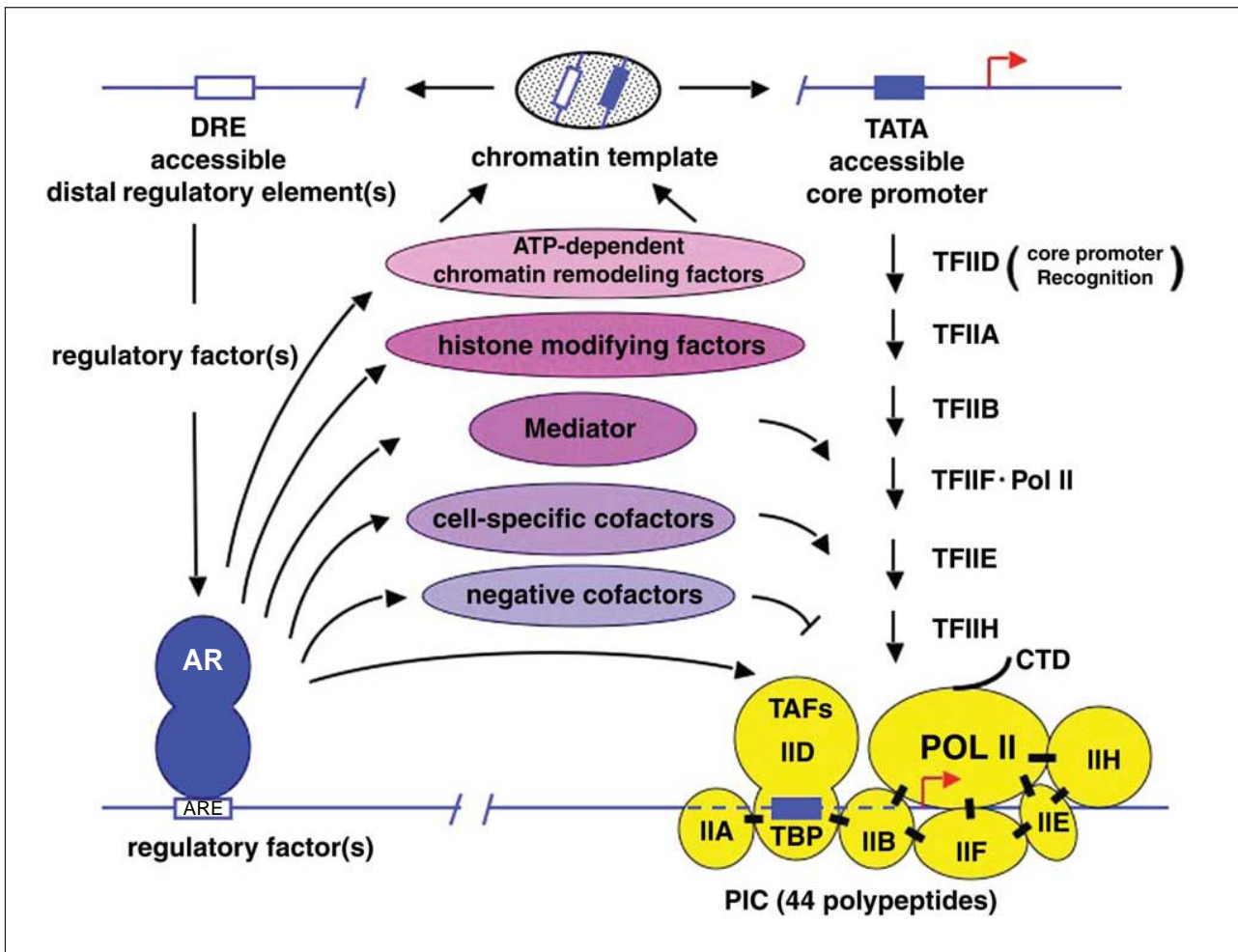


modifiée chez la levure, Zhang et coll. ont identifié une protéine qu'ils ont nommée ARA 67 (*AR-associated protein 70kDa*) (Zhang et al., 2004). Le clone ARA67 s'est révélé être similaire à une protéine qui interagit avec APP (*amyloid precursor protein*), protéine membranaire impliquée entre autre, dans la maladie d'Alzheimer (Tang, 2005). Cette protéine qui se nomme PAT1 (*protein interacting with APP tail 1*) présente une homologie avec la chaîne légère des kinésines et semble être impliquée dans le transport de molécules en association avec les micro-tubules (Zheng et al., 1998). L'interaction entre les deux protéines a été démontrée *in-vitro* et *in-vivo* et ARA67 présente une forte capacité à réprimer la transcription dépendante de AR tout en augmentant son niveau d'accumulation. La co-transfection de ARA67 et AR dans des cellules COS-7 se traduit par une altération de la localisation nucléaire de AR en réponse à la DHT. En effet des expériences d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaire révèlent une séquestration de AR en présence de son ligand dans le compartiment cytoplasmique. L'utilisation d'un mutant de ARA67 cytoplasmique, du à une délétion de son NLS, n'a pas permis de l'impliquer dans un rôle inhibiteur du transfert de AR vers le noyau ou au contraire activateur de son recyclage vers le cytoplasme en raison d'un effet inhibiteur sur le niveau d'accumulation de AR total. Bien que ARA67 ait également été montré comme un inhibiteur de l'interaction N/C de AR, son homologie avec des protéines de transport l'implique clairement dans le trafic nucléocytoplasmique de AR.

Le transfert du récepteur des androgènes du cytoplasme vers le noyau est un évènement nécessaire mais non suffisant à son activité transcriptionnelle. En effet, dans le noyau le récepteur fait l'objet de nombreuses régulations mises en places par le jeu d'interactions avec d'autres protéines co-régulatrices.

## **B. Les co-régulateurs de AR et son recrutement sur l'ADN.**

La régulation de la transcription des gènes de classe II chez les eukaryotes est un processus complexe qui nécessite les fonctions concertées de trois grands types de facteurs. La première classe est celle des facteurs de transcription, dont AR, qui reconnaissent et lient des séquences spécifiques de l'ADN au niveau des promoteurs proximaux ou distaux. Leurs profils d'expression tissulaire ou temporel leur confèrent une spécificité de réponse à des stimuli physiologiques et environnementaux. La deuxième catégorie est celle de la machinerie transcriptionnelle de base incluant l'ARN polymérase II (*RNA POL II*) et de nombreux



**Figure n°15: Formation du complexe de pré-initiation (PIC) et interaction avec les facteurs de transcriptions spécifiques et les co-facteurs.**

L'initiation de la transcription des gènes androgéno-régulés est induite séquentiellement par i) la fixation des facteurs spécifiques de transcription tels que le récepteur des androgènes au niveau de ses AREs, ii) son interaction avec des protéines de remodelage de la chromatine à activité ATPase, histone méthyl-transférase ou Histone acétyltransférase, iii) l'interaction de ce complexe avec des protéines médiatrices et des co-facteurs qui facilitent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base et établissent un pont entre les facteurs de transcription spécifiques et généraux. TF, Transcription Factor; TBP, TATA Binding Protein; TAFs, TBP associated Factors. D'après Roeder et al, 2005.



facteurs généraux de transcription dénommés GTF qui se lient aux séquences cœur du promoteur telle que la boîte TATA. Enfin, la troisième classe de protéines régulatrices est celle des co-régulateurs (co-activateurs et co-répresseurs) qui vont moduler l'accessibilité des facteurs de transcription aux séquences cibles. Ils jouent leur rôle en changeant la structure de la chromatine notamment en catalysant des modifications au niveau des histones et en formant des ponts entre les facteurs de transcriptions généraux et spécifiques.

Dans cette section, nous allons brièvement décrire quels sont les facteurs généraux de transcription et étudier plus en détail le mode d'action de certains co-régulateurs de AR impliqués dans son recrutement sur l'ADN.

### 1. Facteurs généraux de la transcription.

La machinerie transcriptionnelle de base pour les gènes de classe II se compose d'une enzyme, l'ARN POL II et de six facteurs généraux de transcription dénommés TFIIA (*Transcription Factor IIA*), TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH (Martinez, 2002) (**figure n°15**). Le complexe TFIID est composé de la protéine de reconnaissance de la boîte TATA, TBP (*TATA binding protein*) et de plusieurs TAFIIs (*TBP associated factors*). Après reconnaissance de séquences cibles sur l'ADN au niveau de la région cœur du promoteur telles que la boîte TATA ou la séquence BRE (*TFIIB-response element*), ces facteurs de transcription s'assemblent séquentiellement en un complexe multiprotéique et recrutent l'ARN POL II : cet ensemble forme le complexe de pre-initiation (*PIC : preinitiation complex*). Chacun de ces TFII est composé de nombreuses sous-unités protéiques et l'ARN POL II est elle-même formée de douze polypeptides. La région cœur du promoteur reconnue et occupée par le PIC est définie comme la séquence d'ADN minimale nécessaire et suffisante pour initier la transcription par l'ARN POL II.

Un test d'interaction impliquant le domaine N-terminal de AR a mis en évidence son affinité pour les deux sous-unités de TFIIF (McEwan and Gustafsson, 1997). De plus, les auteurs ont montré un effet inhibiteur et dose dépendant de cette portion de AR (qui ne se lie pas à l'ADN) sur l'activité transcriptionnelle d'une protéine AR sauvage. Ce phénomène qualifié de « squelching » reflète un défaut de recrutement des facteurs généraux de transcription pour l'activité transcriptionnelle de AR engendré par leur liaison au fragment N-terminal en excès. Le fait que cet effet puisse être renversé par l'addition de TFIIF recombinant montre que le contrôle de l'activité transcriptionnelle, résultant de l'interaction entre les facteurs généraux et



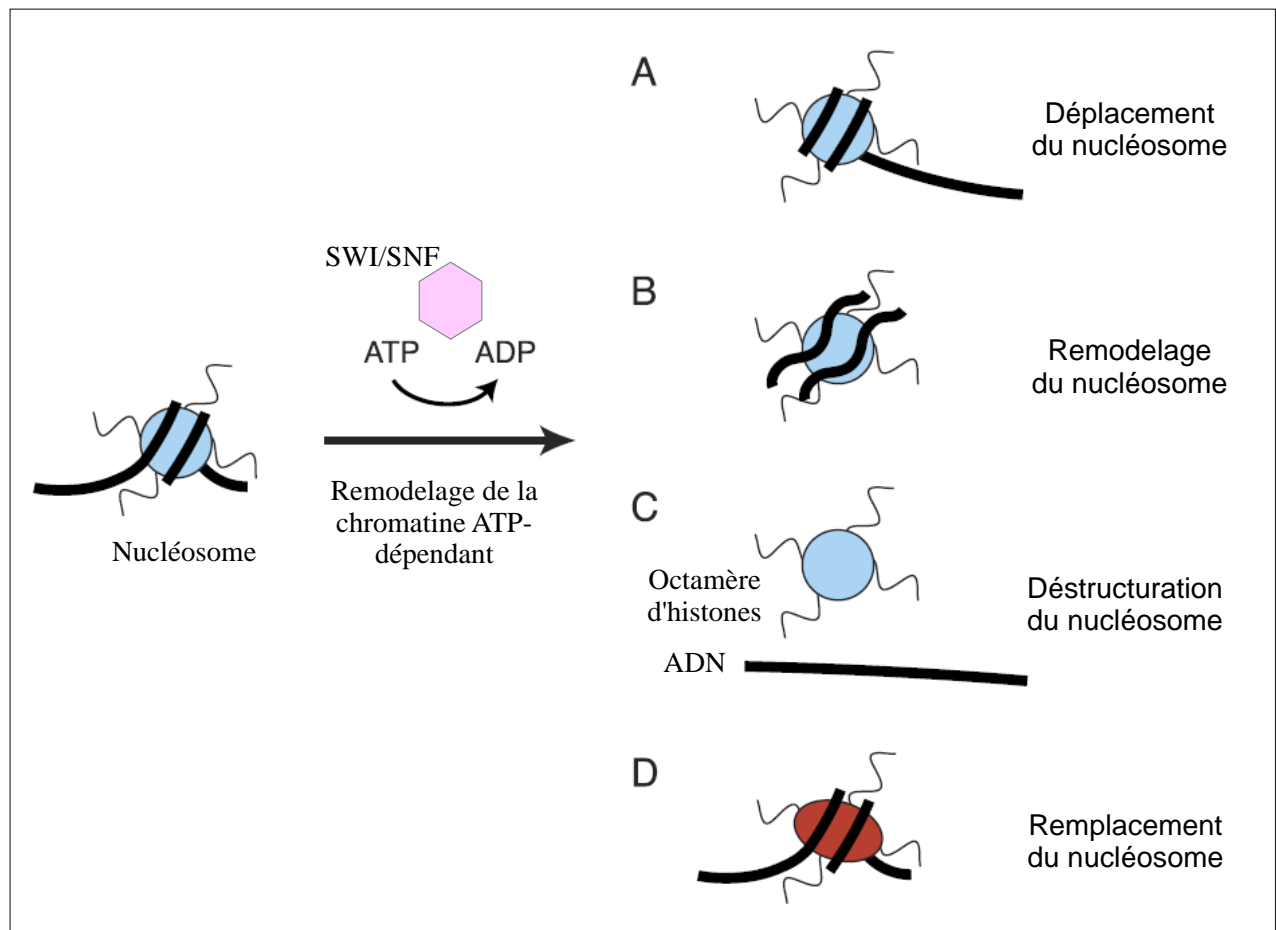
spécifiques de transcription, est déterminé par les concentrations relatives de ces derniers dans le compartiment nucléaire.

D'autres interactions entre AR et certaines protéines du PIC ont aussi été mises en évidence. En 2000, Lee et coll. rapporte l'interaction de AR avec plusieurs sous-unités de TFIID et une régulation positive de l'activité transcriptionnelle de AR par la surexpression de ces mêmes protéines (Lee et al., 2000a). De même il semblerait que AR puisse interagir *in-vitro* avec une sous-unité de la ARN POL II (Lee and Chang, 2003a).

Les interactions entre les facteurs de transcription et les GTF sont évidentes et permettent une régulation active de la transcription. La flexibilité de la structure chromatinienne permet en partie d'expliquer comment des protéines liées à des séquences plus ou moins éloignées sur l'ADN peuvent établir des interactions. Ces communications sont également facilitées par le recrutement d'autres protéines qui jouent un rôle de pont entre les facteurs de transcription et les éléments du PIC.

## 2. Modulateurs positifs de l'état chromatinien.

Les unités fonctionnelles de la chromatine sont les nucléosomes reliés entre eux par l'ADN bicaténaire. Chaque nucléosome est constitué d'un octamère de deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 entouré par un brin d'ADN de 146 paires de base. La compaction de l'ADN par les histones et les structures chromatiniennes d'ordre supérieur affecte, et par là même contrôle, les interactions ADN-protéines impliquées dans la transcription (Glass and Rosenfeld, 2000). Ainsi, les modifications de la structure chromatinienne permettent le contrôle de l'initiation de la transcription au niveau des régions promotrices. Il existe plusieurs co-régulateurs de cette structure. Les premiers sont les complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (*adénosine tri-phosphate*) qui altèrent l'association de l'ADN et des nucléosomes facilitant ainsi leur déplacement. Le deuxième type est celui d'enzymes qui possèdent une activité Histone AcétylTransférase (*HAT*) ou Histone DéAcétylase (*HDAC*) et qui contrôlent le niveau d'acétylation des queues des histones influençant ainsi leur interaction avec l'ADN, avec les nucléosomes adjacents ou avec d'autres protéines régulatrices. Les protéines à activité HAT régulent positivement la structure chromatinienne en la relâchant alors que celles à activité HDAC la modulent négativement.



**Figure n°16: Remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP.**

Le remodelage de la chromatine par hydrolyse de l'ATP fait intervenir différents mécanismes non-exclusifs qui modulent la structure des nucléosomes en changeant les interactions ADN-histones. A. L'octamère d'histones change de position sur l'ADN. B. L'ADN adopte une conformation plus ouverte. C. L'ADN et les histones se détachent, le nucléosome perd sa structure. D. L'octamère d'histones est remplacé par un autre octamère d'histones. SWI/SNF: switch/sucrose nonfermenting. Modifié d'après Mohrmann et Verrijzer, 2005.

a. Remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP.

Le complexe SWI/SNF (switch/sucrose nonfermenting) identifié chez la levure est hautement conservé chez les eucaryotes (Laurent et al., 1993; Peterson and Herskowitz, 1992). Chez les mammifères, le complexe est composé d'une des deux sous-unités à domaine ATPase, BRM (*brahma*) ou BRG1 (*brahma-related gene 1*) en association avec de nombreux facteurs BAFs (*BRM/BRG1 associated factors*). L'ensemble de ces facteurs est impliqué dans le remodelage de la chromatine avec des activités sur l'ADN de type hélicase mises en oeuvre par hydrolyse de l'ATP (**figure n°16**). Dans une étude publiée en 2003, Huang et coll. ont montré que l'activation de AR par son ligand (R1881) est associée à un remodelage de la chromatine avec perte de la densité des super-hélices négatives (Huang et al., 2003). Par immuno-précipitation de chromatine, ils ont mis en évidence l'association de cet évènement au recrutement de BRG1 sur le promoteur d'un gène cible de AR (MMTV : *mouse mammary tumor virus*). De plus, des cellules SW13 déficientes en BRG1 présentent une absence de la transcription dépendante de AR, restaurée par l'expression transitoire d'une protéine sauvage BRG1. A l'aide de ces mêmes cellules SW13 et du promoteur de la probasine, une autre équipe a obtenu des résultats similaires confirmant le rôle de BRG1 sur l'activité transcriptionnelle de AR avec comme information supplémentaire, un effet dépendant du domaine à activité ATPase (Marshall et al., 2003). Néanmoins, il semble que l'expression exogène de la sous-unité BRM restaure de façon plus importante que BRG1 l'activité transcriptionnelle de AR. Un autre élément intéressant est le comportement totalement différent du promoteur PSA. En effet, si ce dernier est dépourvu de son AREIII (*enhancer*), seul l'ajout de BRM peut restaurer l'activité transcriptionnelle de AR dans les cellules SW13 alors que BRG1 n'a aucun effet. Par contre, en présence de cet *enhancer*, le récepteur présente une activité indépendante de BRM. L'ajout de cet élément *enhancer* au promoteur de la probasine ne reproduit pourtant pas cet effet. Ainsi, il apparaît l'existence d'une régulation transcriptionnelle complexe dépendante des protéines SWI/SNF mais aussi largement régulée par le contexte du promoteur. Bien qu'une interaction directe entre AR et BRM ou BRG1 n'ait pas encore été montrée, un test de double-hybride chez la levure a mis en évidence leur interaction ligand-dépendante avec le récepteur des œstrogènes (Ichinose et al., 1997). De plus, AR et une protéine à activité ATPase de la famille SNF2 dénommée ARIP4 (androgen receptor interacting protein 4) interagissent *in-vitro* et *in-vivo* (Rouleau et al., 2002). Cette protéine a la capacité de moduler la structure chromatinienne et de réguler positivement l'activité transcriptionnelle de AR de façon dépendante de son activité ATPase. De même, il a été

Similarity (Identity): hSRC1/2, 54% (46%); hSRC1/3, 50% (43%); hSRC2/3, 55% (48%)

hSRC1/2: 73%(64%)

55%(48%)

42%(36%)

hSRC1/3: 67%(59%)

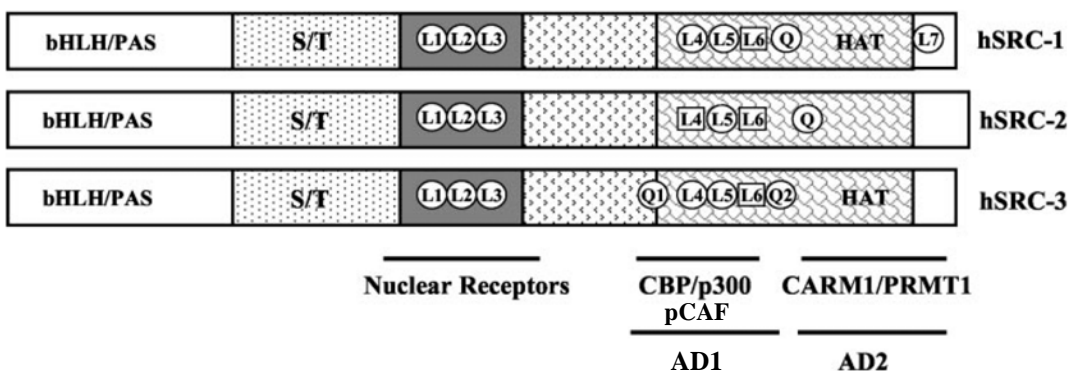
55%(45%)

45%(38%)

hSRC2/3: 71%(63%)

64%(58%)

52%(46%)



bHLH/PAS : Domaine basic Helix Loop Helix/Per.ARNT.Sim

S/T : Domaine riche en Sérines/Thréonines

AD : Domaine d'activation transcriptionnelle

HAT : Domaine à activité Histone Acétyltransférase

(L) : Motif LXXLL classique: L, Leucine; X, acide aminé

[L] : Motif LXXLL non-classique

(Q) : Domaine riche en Glutamines

### Figure n°17: Structures et domaines fonctionnels des membres de la famille SRC.

Sont représentés sur cette figure la structure des différentes protéines humaines de la famille SRC avec leurs identités de séquences (%), leurs domaines fonctionnels et leur domaines d'interaction avec d'autres protéines qui participent à la transcription dépendante des récepteurs nucléaires. D'après Xu et Li, 2003.

montré une interaction entre AR et un facteur associé à BRM, BAF57 dont l'absence se traduit par un défaut d'activité transcriptionnelle de AR modulée une nouvelle fois par l'activité ATPase de BRM (Link et al., 2005).

L'ensemble de ces informations implique clairement les protéines de remodelage de la chromatine de type SWI/SNF dans la régulation de la transcription dépendante des androgènes. En outre, l'étude de Huang et coll. met aussi en évidence le caractère nécessaire mais non suffisant du complexe SWI/SNF et pointe clairement le recrutement d'autres facteurs tels que celui de protéines à activité HAT (Huang et al., 2003).

#### b. Les co-activateurs de AR à activité HAT.

##### ➤ La famille p160/SRC.

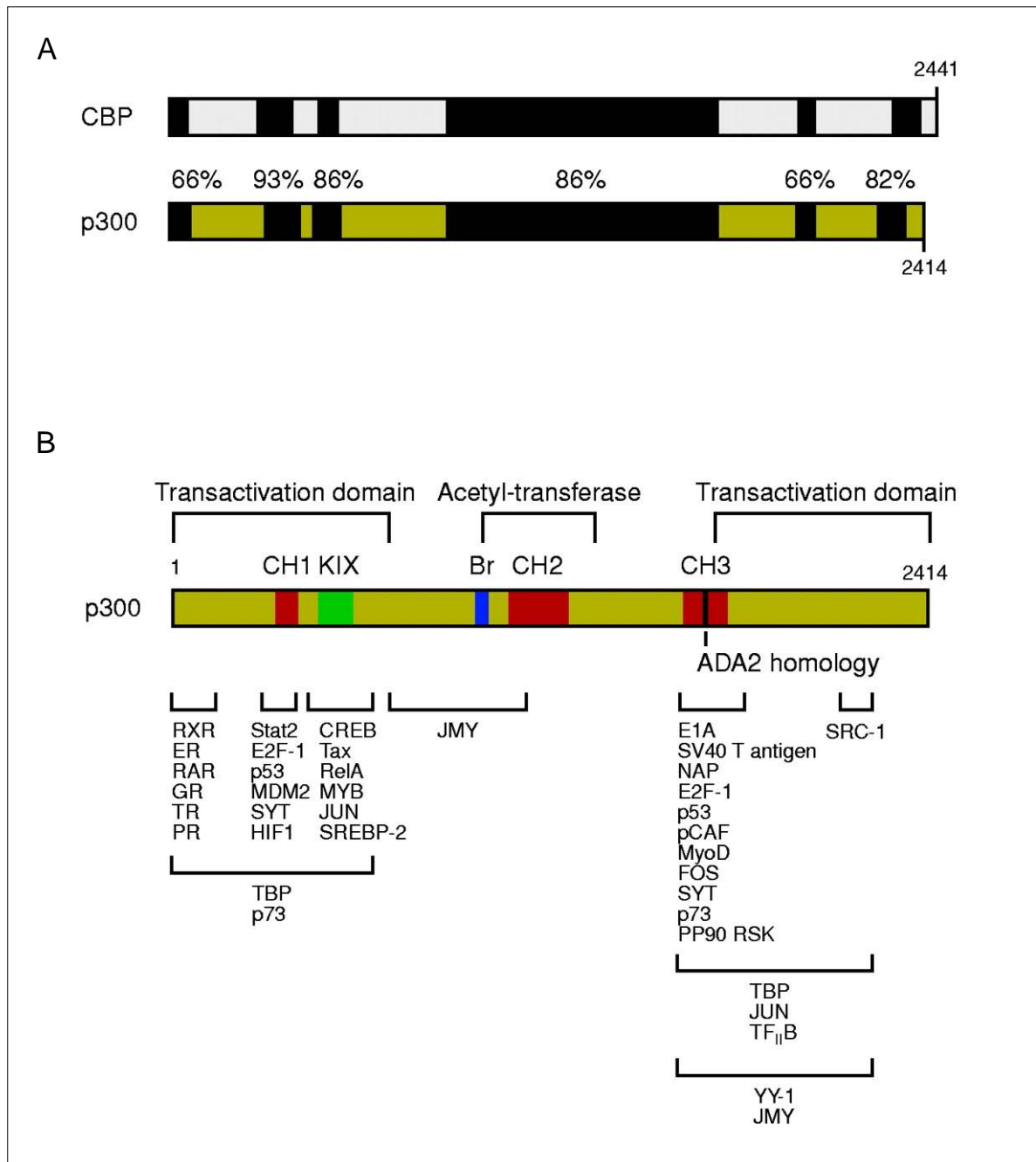
La famille p160/SRC est un groupe de co-activateurs dont trois membres ont été identifiés chez les humains et les rongeurs (*figure n°17*). Le premier, SRC1/NcoA-1 a originellement été cloné comme partenaire d'interaction de PR, ER et TR en présence de leur ligand. Le second membre SRC2/GRIP1/NcoA-2/TIF2 a été identifié par sa liaison au LBD de ER et GR. Enfin SRC3/pCIP/ACTR/AIB1/TRAM1/RAC3 a lui été identifié comme un gène amplifié dans le cancer du sein puis ensuite montré comme étant un co-activateur des récepteurs nucléaires (Leo and Chen, 2000; Xu and Li, 2003). (SRC : *steroid receptor co-activator*, NcoA : *nuclear receptor coactivator*, GRIP1 : *glucocorticoid receptor-interacting protein 1*, TIF2: *transcriptional intermediary Factor 2*, pCIP : *p300/CBP cointegrator associated protein*, ACTR: *acetyltransferase*, AIB1: *amplified in breast cancer 1*, TRAM1: *thyroid hormone receptor activator molecule 1*, RAC3: *receptor associated coactivator 3*). Ces membres de la famille SRC sont des co-activateurs d'un grand nombre de récepteurs nucléaires mais aussi de facteurs de transcription autres tels que AP-1 (Lee et al., 1998b; Na et al., 1998) ou encore NF-κB (*nuclear factor κB*) (Na et al., 1998). Les protéines SRC présentent une identité de séquence peptidique de 43-48 %. Le domaine le plus conservé est le domaine N-terminal bHLH/PAS (*basic helix loop helix/ Per.ARNT.Sim*), suivi d'une région riche en sérines et thréonines, d'une région centrale contenant trois motifs LxxLL responsables de la fixation aux récepteurs nucléaires et de deux domaines de transactivation C-terminaux AD1 et AD2 (*activation domain*). La région AD1 est responsable de l'interaction avec des co-facteurs à activité acétyltransférase de type CBP/p300 (*CREB-*





*binding protein/p300*) et pCAF (*p300/CBP associated factor*) (Li et al., 2000; Spencer et al., 1997; Voegel et al., 1998) alors que le domaine AD2 recrute les co-facteurs à activité histones méthyltransférase CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1* (Chen et al., 1999a)) et PRMT1 (*protein arginine N-methyltransferase* (Koh et al., 2001)). Il faut également noter un domaine à activité histone acétyltransférase au niveau des régions C-terminales de SRC1 et SRC3 impliquant ces protéines dans la modification de l'état chromatinien (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997). Néanmoins, plusieurs arguments suggèrent que les co-activateurs p160 joueraient plutôt un rôle indirect sur le remodelage de la chromatine en se comportant comme une plateforme de recrutement d'autres protéines à activité HAT ou méthyltransférase (Koh et al., 2001). En effet, leur activité HAT est beaucoup plus faible que celle de CBP/p300 ou de pCAF. De plus, l'interaction directe de CBP/p300 avec SRC1 est plus forte que celle de CBP/p300 avec les récepteurs nucléaires (Heery et al., 2001; Sheppard et al., 2001). Enfin, la capacité de p300 à réguler positivement l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est fortement réduite après délétion de son domaine d'interaction avec SRC1 et non de son domaine d'interaction avec les récepteurs (Kraus et al., 1999; Li et al., 2000). Bien que le domaine AD2 responsable du recrutement de CARM1 et PRMT1 ne semble pas nécessaire à l'activité transcriptionnelle de AR (Powell et al., 2004), un modèle propose que le récepteur des androgènes lié à l'ADN puisse recruter, par l'intermédiaire des protéines SRC, d'autres protéines de remodelage de la chromatine possédant des activités HAT ou histone méthyltransférase, autorisant ainsi la formation du complexe de préinitiation de la transcription.

La connaissance des fonctions biologiques des membres de la famille SRC est en partie basée sur les profils d'expression ribonucléiques et protéiques et sur les phénotypes des souris invalidées pour les différents membres. Certains tissus tels que le cerveau, le foie ou le cœur expriment plusieurs types de protéines de la famille SRC alors que d'autres tissus présentent une spécificité d'expression. Par exemple, dans les cellules de Sertoli, SRC2 est fortement accumulée alors que le niveau de SRC1 est faible et l'on ne détecte pas SRC3 (Gehin et al., 2002; Mark et al., 2004). Si les souris invalidées pour SRC1 ont une croissance et une fertilité normale, elles présentent une résistance partielle aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes avec notamment une prise de poids inférieur de la prostate et de l'urètre chez des animaux SRC1<sup>-/-</sup> castrés et supplémentés en testostérone pendant sept jours par rapport à des animaux sauvages (Xu et al., 1998). On note aussi des désordres de dimorphisme sexuel du cerveau (Auger et al., 2000). Les animaux invalidés pour SRC2 présentent une hypofertilité mâle avec un défaut de la spermatogenèse et femelle avec une hypoplasie placentaire (Gehin et al., 2002;



**Figure n°18: Représentation schématique des protéines CBP/p300.**

A. Homologies de séquence peptidique entre les deux protéines. B. Localisation des deux domaines de transactivation, du domaine à activité acétyl-transférase, des trois régions riches en cystéines/histidines (CH1, 2 et 3), du bromodomaine (Br) et du domaine KIX (responsable de l'interaction avec d'autres protéines). Les régions d'interaction de p300 avec d'autres protéines sont également mentionnées. D'après Chan et La Thangue, 2001).

Picard et al., 2002). Les animaux ont également des troubles du métabolisme lipidique (Picard et al., 2002). Les souris invalidées pour SRC3 ont un retard de croissance et une taille adulte inférieure probablement dû à un niveau inférieur d'IGF1 mais aussi une résistance à l'IGF1 (*insuline like growth factor 1*) (Wang et al., 2000; Xu et al., 2000). Ces souris présentent aussi un niveau d'œstrogènes plus faible que les souris sauvages avec un retard de puberté, de développement de la glande mammaire et d'ovulation (Xu et al., 2000). L'homologie de séquence des différents membres SRC, leurs profils d'expression partiellement chevauchants et la viabilité des souris invalidées suggèrent qu'ils peuvent partiellement se compenser *in-vivo*. Cependant, des études montrent une affinité variable des récepteurs nucléaires pour certains des membres de la famille SRC et les fenêtres d'expression temporelles et spatiales de chacun de ces membres semblent conférer une spécificité de réponse aux hormones stéroïdes (Li et al., 2003).

#### ➤ Les médiateurs CBP/p300.

Les protéines CREB-binding protein et p300, bien que très similaires, sont codées par deux gènes distincts (**figure n°18**). La première a été identifiée pour son association à la protéine CREB (*cAMP response element*, (Chrivia et al., 1993)) et la deuxième pour son association à la protéine virale E1A (Eckner et al., 1994a; Eckner et al., 1994b). CBP/p300 ont depuis, été montrées comme interagissant avec de nombreux facteurs de transcription tels que AP1, p53, NF-κB mais aussi des récepteurs nucléaires dont AR (Chan and La Thangue, 2001; Eckner et al., 1994a; Eckner et al., 1994b; Fronsdal et al., 1998). Ces protéines interagissent aussi avec des composants de la machinerie transcriptionnelle de base tels que TBP, TFIIB et ont été purifiées dans un complexe contenant la ARN POL II (Cho et al., 1998). De plus, les protéines CBP/p300 présentent aussi des affinités pour d'autres co-activateurs tels que SRC1 (Li et al., 2000), pCIP (*p300/CBP cointegrator-associated protein*, (Leo and Chen, 2000)) ou pCAF (Yang et al., 1996) et possèdent un domaine central à activité histone acétyltransférase (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996). L'ensemble de ces éléments les implique dans un rôle de modulateurs de la transcription par remodelage de la chromatine d'une part et formation d'un pont entre les récepteurs nucléaires fixés à l'ADN, les autres co-régulateurs tels que ceux de la famille SRC, et les éléments de la machinerie transcriptionnelle d'autre part; on les qualifie de médiateurs. Un argument supplémentaire quant au rôle central des protéines CBP/p300 est l'effet négatif de l'inhibition de l'activité HAT de CBP/p300 ou de son interaction avec SRC1 sur la transcription dépendante des



androgènes (Huang et al., 2003). Néanmoins, leur activité acétyltransférase n'est pas restreinte aux histones et il a été montré que CBP et p300 pouvaient aussi modifier le niveau d'acétylation du récepteur des androgènes (Fu et al., 2000; Gong et al., 2006). Cette acétylation est de plus capitale pour la fonction transactivatrice de AR puisque des mutations sur les lysines normalement acétylées induisent une perte de l'activité transactivatrice de AR. Un rapport plus récent met en évidence un changement de la charge de AR par acétylation des résidus lysines qui se traduit par une plus forte affinité pour p300 et au contraire, une perte d'affinité pour les co-represseurs N-CoR, Smad 3 (*human Sma and Mad homolog*) et HDAC1 (Fu et al., 2003). Cela signifie que l'acétylation des résidus lysines de AR par p300 amplifie le signal d'activation de la transcription en favorisant le recrutement de nouveaux co-activateurs et inversement le non recrutement de co-represseurs. De plus, ce rapport fait aussi le lien entre ces modifications et la croissance des cellules prostatiques tumorales DU145. Enfin, p300 semble aussi être impliquée dans la transactivation de AR indépendante de son ligand et initiée par le facteur de croissance IL6 (*interleukine 6*) (Debes et al., 2002).

Le fort degré d'homologie entre CBP et p300 suggère que ces protéines pourraient, au moins en partie, avoir une action fonctionnelle redondante. En effet, de nombreuses études ont permis de les impliquer dans un rôle de co-activateur d'au moins quarante facteurs de transcription et des expériences de surexpression transitoire ont pu mettre en évidence leur rôle interchangeable (Goodman and Smolik, 2000; Vo and Goodman, 2001). Les souris invalidées pour chacun de ces gènes présentent une léthalité embryonnaire avec un défaut de formation du tube neural (Yao et al., 1998) avec une haploinsuffisance pour p300. Néanmoins, certains phénotypes des souris invalidées CBP et p300 indiquent également que chacun de ces gènes possède des fonctions propres. Par exemple, les souris CBP<sup>+/-</sup> présentent des défauts de différenciation hématopoïétiques alors que les souris p300<sup>+/-</sup> sont elles normales pour ce phénotype (Kung et al., 2000). Inversement, les souris invalidées pour p300 présentent des défauts de développement du cœur (Yao et al., 1998) contrairement aux souris invalidées pour CBP (Tanaka et al., 1997). Enfin, il faut noter que des mutations ponctuelles, des délétions ou des translocations du gène CBP sont responsables du syndrome de Rubinstein-Taybi (*RTS*). Cette pathologie se caractérise entre autre, par un défaut de croissance, un retard mental et des malformations cranio-faciales ou un risque plus élevé de formations de tumeurs (Miller and Rubinstein, 1995; Petrij et al., 1995).



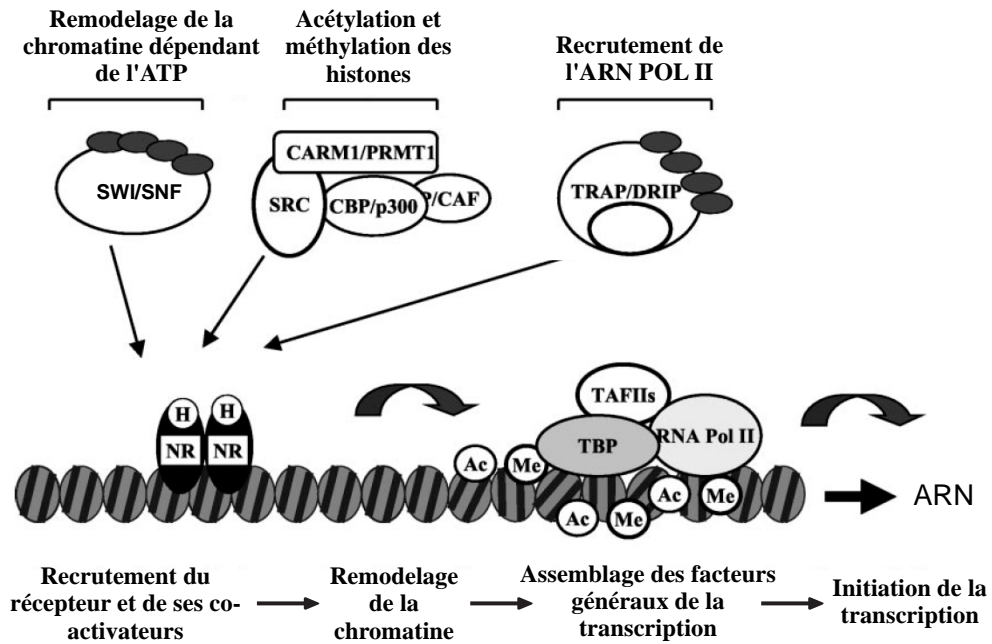
➤ Le facteur pCAF.

La protéine pCAF a originellement été identifiée comme un compétiteur de l'oncoprotéine adénovirale E1A pour sa liaison à CBP/p300 (Yang et al., 1996). Comme CBP/p300, elle contient un domaine HAT mais ses substrats sont différents avec une acétylation préférentielle de certaines lysines présentes sur les histones H3 et H4 (Schiltz et al., 1999). Cette capacité à moduler l'acétylation des histones implique également pCAF dans la régulation de la transcription et notamment de celle de plusieurs récepteurs nucléaires tels que les récepteurs stéroïdiens ER (McMahon et al., 1999) ou encore GR (Li et al., 2003) ou l'hétérodimère RXR/RAR (Blanco et al., 1998). Une étude de Fu et coll. a mis en évidence une interaction entre pCAF et le récepteur des androgènes et surtout une acétylation de AR par pCAF (Fu et al., 2000). De plus, les auteurs mettent en évidence un effet co-activateur de pCAF sur l'activité transcriptionnelle de AR qui est réprimé par des mutations ponctuelles des lysines acétylées par pCAF. En outre, pCAF peut s'opposer à l'effet répresseur de protéines comme la cycline D1 par une liaison compétitive sur les mêmes sites de fixation à AR, favorisant ainsi l'activité transactivatrice de AR (Reutens et al., 2001). Ainsi, la protéine pCAF, par son activité acétyltransférase, semble jouer un double rôle. En effet, pCAF peut acétyler les histones et faciliter l'accessibilité d'autres protéines à la chromatine en modulant sa structure mais aussi participer plus directement à la transcription dépendante de AR en modifiant son niveau d'acétylation. Cette acétylation du récepteur est supposée faciliter son accessibilité à l'ADN et son affinité pour d'autres protéines co-activatrices ou co-repressives.

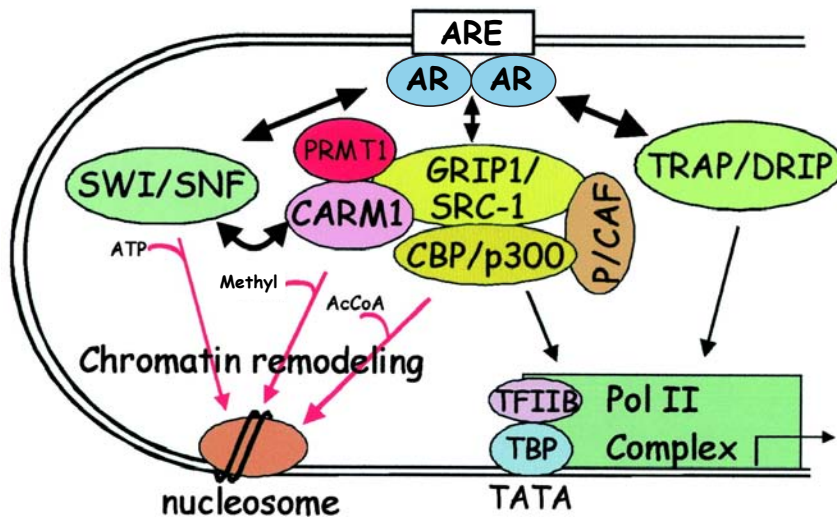
c. Les co-activateurs de AR à activité histones méthyltransférases.

La protéine CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) appartient à la famille des PRMT (*protein arginine N-methyltransferase*) et comme son nom l'indique possède une activité de méthylation de résidus arginine sur les histones H3 (Schurter et al., 2001). Même si le rôle fonctionnel de la méthylation des résidus arginines sur la conformation des histones est encore peu déterminé, il est supposé que cette modification ne change pas la charge électrique nette mais plutôt la masse et l'hydrophobicité et ainsi promeut ou inhibe les interactions inter- ou intra-moléculaires. La protéine CARM1 a été identifiée dans un crible double-hybride impliquant le co-activateur GRIP1. Elle régule la transcription dépendante des

A



B



**Figure n°19: Schéma de recrutement séquentiel (A) et de coopération (B) des complexes de remodelage de la chromatine, des facteurs de transcription spécifiques et généraux et des co-facteurs.**

Les facteurs de transcription spécifiques tels que AR se lient au niveau de leur séquence cible sur l'ADN, interagissent avec des protéines de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (SWI/SNF), à activité méthyltransférase (CARM1, PRMT1) et à activité histone acétyltransférase (GRIP1/SRC-1, CBP/p300, pCAF). Le remodelage de la chromatine et le recrutement de médiateurs tels que le complexe TRAP/DRIP favorisent le recrutement et le fonctionnement des facteurs généraux de la transcription et l'initiation de la transcription. Ces mêmes médiateurs établissent également une connexion entre les facteurs spécifiques et généraux de la transcription. Modifiés D'après Xu et Li, 2003; Lee et al., 2005.

TRAP/DRIP: Thyroid hormone Receptor-Associated Protein/vitamin D3 Receptor Interacting Protein; Ac, acétyl; Me, méthyl; NR, nuclear receptor.



androgènes en se comportant comme un co-facteur secondaire (Chen et al., 1999a). En effet, les auteurs ont montré que la capacité de CARM1 à augmenter l'activité transcriptionnelle de AR était dépendante de la présence de SRC-1 et GRIP1. D'autres études montrent une fonction synergique de CARM1 avec plusieurs co-activateurs de AR : la  $\beta$ -caténine et p300 (Koh et al., 2001; Koh et al., 2002) mais aussi pCAF (Lee et al., 2002). De plus CARM1 a aussi été montrée comme un catalyseur de méthylation de protéines autres que les histones et notamment de CBP (Chevallard-Briet et al., 2002). Cette méthylation de CBP est de plus nécessaire pour l'activité de co-activateur de GRIP1 impliquant le recrutement de ces trois protéines dans un complexe de régulation de la transcription dépendante des stéroïdes. Plus récemment une étude de Xu et coll. a aussi mis en évidence une coopération entre les protéines de modification des histones portant une activité ATPase et arginine méthyltransférase (Xu et al., 2004). Les auteurs montrent une interaction directe entre les protéines BRG1 (SWI/SNF) et CARM1 (PRMT) et leur coopération dans la régulation de la transcription dépendante des œstrogènes. Il apparaît ainsi une communication et des connexions croisées entre les protéines de remodelage de la chromatine de type SWI/SNF, les protéines à activité HAT et les protéines à activité méthyltransférase (*figure n°19*).

La protéine CARM1 n'est pas la seule méthyltransférase impliquée dans la transcription dépendante des androgènes. En effet, une autre histone méthyltransférase fonctionne aussi comme un co-activateur pour les récepteurs nucléaires AR et ER : l'histone H3 Lysine 9 Methyltransférase G9a (Lee et al., 2006). Les auteurs ont montré qu'elle exerce son action de façon synergique avec CARM1 et GRIP1 avec lesquels elle interagit et son inactivation ciblée résulte en un défaut de transcription du gène *PSA* ciblé par AR. Il semble néanmoins que dans certains contextes de promoteurs et de disponibilité de co-facteurs, l'activité méthyltransférase de G9a soit aussi responsable d'une inhibition de la transcription (Lee et al., 2006; Nishio and Walsh, 2004; Roopra et al., 2004).

La régulation de la transcription dépendante des androgènes et des autres récepteurs nucléaires apparaît assez complexe. L'initiation de la transcription est en effet dépendante de nombreuses protéines co-activatrices de AR qui agissent de façon concertée et interdépendante pour moduler l'état de la chromatine et ainsi, imprimer à la machinerie de transcription le message initié par la fixation du récepteur à ses éléments de réponse (*figure n°19*). Les proportions relatives de ces facteurs sont déterminantes dans la formation des complexes qui résultent de la compétition entre les facteurs de transcription et les autres protéines nucléaires pour la liaison avec des protéines régulatrices capables de modifier la structure chromatinienne.

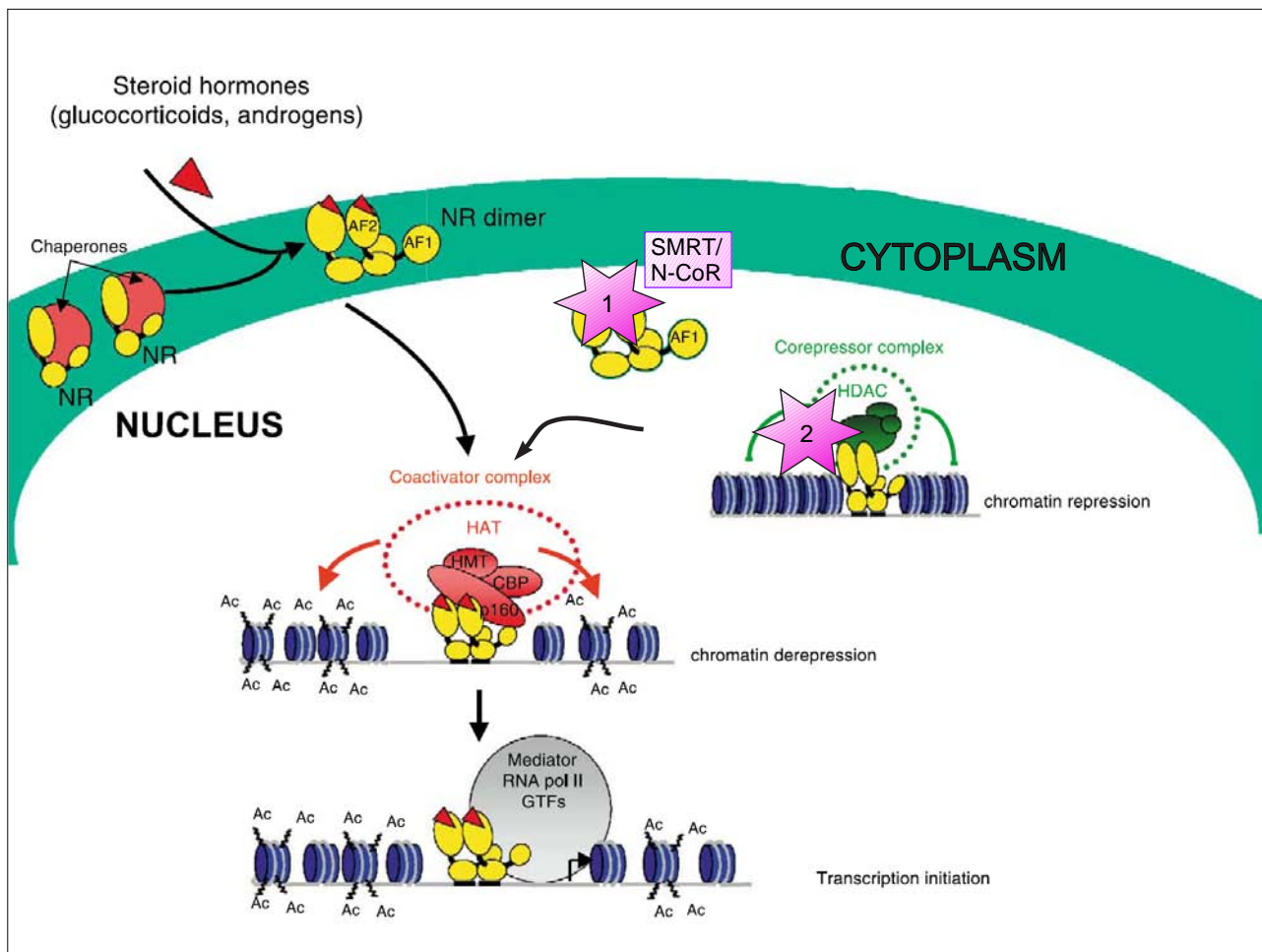


### 3. Modulateurs négatifs de l'état chromatinien.

Nous venons d'étudier précédemment un certain nombre de protéines impliquées dans la transcription dépendante du récepteur des androgènes par leur effet positif sur l'accessibilité à la chromatine. Même si le nombre de co-répresseurs de AR identifiés est peu important en regard de celui des co-activateurs, et que leur mode fonctionnement *in-vivo* est moins bien caractérisé, il est évident qu'ils jouent aussi un rôle critique dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes. Certains de ces co-répresseurs exercent aussi leur effet en modulant la structure chromatinienne mais de façon négative : ils referment la chromatine en la compactant et ainsi limitent l'activité transcriptionnelle du récepteur. Dans le paragraphe suivant nous allons étudier plusieurs de ces protéines.

#### a. Le modulateur HDAC1.

Les acteurs principaux de la modulation négative de l'état chromatinien sont les histones déacétylases. Il est désormais largement admis que leur action de déacétylation des histones restreint la charge négative des nucléosomes et compacte la chromatine, la rendant moins accessible aux facteurs de transcription (Lopez-Rodas et al., 1993). Chez l'homme, il existe 18 HDACs réparties en quatre grandes classes en fonction de leur identité de séquences ou de leur mode de fonctionnement (de Ruijter et al., 2003; Yang and Gregoire, 2005). La classe I comprend les membres HDAC 1, 2, 3 et 8. Une étude de Gaughan et coll. a mis en évidence une interaction *in-vitro* et *in-vivo* entre HDAC1 et AR (Gaughan et al., 2002). De façon intéressante, la surexpression de HDAC1 inhibe la transcription dépendante de AR. De plus, les auteurs ont montré que cet effet était dépendant de l'activité déacétylase de HDAC1 et qu'il pouvait être renversé par la surexpression de Tip60 (*Tat-interactive protein 60 kDa*), protéine à activité HAT qui interagit avec AR et l'acétyle directement. Enfin, une immunoprécipitation de chromatine a permis de mettre en évidence le recrutement de AR, Tip60 et HDAC1 sur le promoteur du PSA dans des cellules LNCaP après une incubation avec un agoniste synthétique (R1881) pendant 20 minutes. Si ce recrutement de HDAC1 en réponse à l'hormone semble étonnant, la surexpression de HDAC1 dans ces mêmes cellules LNCaP se traduit par une répression de l'activité transcriptionnelle de AR. Un autre rapport décrit le recrutement de HDAC1 sur ce même promoteur en réponse à un antiandrogène, le bicalutamide (Shang et al., 2002). Ainsi, ces différentes études impliquent clairement la



**Figure n°20: Différents modes d'action des co-répresseurs SMRT/N-CoR.**

Les co-répresseurs SMRT/N-CoR sont supposés agir à plusieurs niveaux pour inhiber l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes. Tout d'abord, ces protéines peuvent se lier à AR (1) et inhiber l'interaction entre ses domaines N et C terminaux. De plus, par cette liaison, elles entrent en compétition avec des protéines co-activatrices telles que SRC1 ou TIF2. Enfin, elles peuvent aussi participer à la formation d'un complexe co-répresseur (2) au niveau de l'ADN en facilitant le recrutement d'autres co-répresseurs et notamment des HDACs (histone déacétylase). Ceci se traduit par une compaction de la chromatine et prévient ainsi l'initiation ou la progression de la transcription. Une inversion des équilibres protéiques entraîne le recrutement de co-activateurs et de protéines qui lèvent la répression sur la structure chromatinienne, la fixation de l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de la transcription et l'initiation de la transcription. SMRT/N-CoR, Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors/ Nuclear Receptor CoRepressor; NR, nuclear receptor; HDAC, histone déacétylase; HAT, histone acétyl transférase; GTFs, general transcription factors; HMT, histone méthyl transférase; Ac, acétyl. Modifié d'après Rochette-Egley, 2002.

participation de la protéine HDAC1 dans la régulation transcriptionnelle de AR par des mécanismes en étroite relation avec la structure chromatinienne.

#### b. Les co-répresseurs SMRT/N-CoR.

La protéine SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*) et son homologue N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) sont deux co-répresseurs largement caractérisés pour de nombreux récepteurs nucléaires (Ordentlich et al., 2001; Privalsky, 2001). Ces deux protéines sont souvent associées en raison de l'identité qu'elles partagent. Leur structure présente plusieurs domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires par l'intermédiaire de boîtes appelées RID (*receptor interacting domains*) et des domaines de répression transcriptionnelle (RD : *repression domains*) impliqués dans des interactions avec d'autres protéines et notamment les HDACs (Privalsky, 2004). Ces deux protéines ont initialement été identifiées pour leurs interactions avec RAR $\alpha$  et TR en absence de leurs ligands respectifs pour faciliter la répression transcriptionnelle (Chen and Evans, 1995; Smith et al., 1997). D'autres études mettent en évidence leur recrutement par ER ou PR en présence d'un antagoniste (Jackson et al., 1997; Smith et al., 1997). Il est fortement supposé que la répression transcriptionnelle exercée par SMRT et N-CoR fasse intervenir les HDACs en association avec d'autres partenaires pour la formation d'un complexe répresseur multi-protéique (Guenther et al., 2000; Heinzel et al., 1997; Nagy et al., 1997).

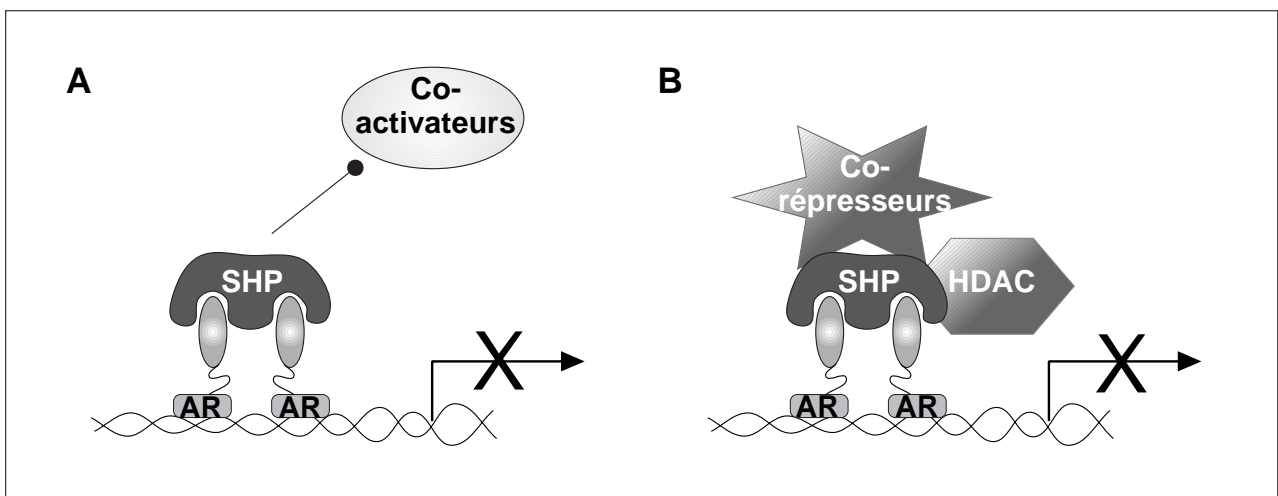
Si les protéines SMRT et N-CoR ont toutes les deux été montrées comme des co-répresseurs de AR, leur mode de fonctionnement sur l'état de la chromatine ne semble pas être direct par recrutement de HDACs mais plutôt par compétition avec des co-activateurs (*figure n° 20*).

Le co-répresseur SMRT est en effet capable d'interagir avec le récepteur des androgènes en absence et en présence de son ligand et cette interaction implique principalement le domaine de liaison du ligand de AR (Liao et al., 2003). Une autre étude de Dotzlaw et coll. a montré que cette interaction était aussi mise en place et de façon plus importante en présence d'un antagoniste comme l'acétate de cyprotérone CPA (Dotzlaw et al., 2002). De plus, ces deux études révèlent un effet négatif d'une surexpression de SMRT sur l'activité transcriptionnelle de AR. L'effet antagoniste du CPA est lui, d'autant plus important que les cellules surexpriment SMRT. Afin de mieux comprendre le mécanisme de répression mis en place par SMRT, les auteurs ont montré qu'il existait une compétition entre SMRT et le co-activateur



TIF2 pour la régulation de l'activité transcriptionnelle de AR. De plus, le co-represseur SMRT semble aussi pouvoir inhiber l'interaction des domaines N et C terminaux de AR.

L'interaction entre AR et N-CoR a été démontrée *in-vitro* et *in-vivo* et ce de façon indépendante de la présence du ligand (Cheng et al., 2002). De plus, les auteurs montrent que la surexpression de N-CoR réprime l'activité transcriptionnelle de AR lorsque celui-ci est lié à son ligand. Cet effet répresseur est indépendant du recrutement de HDACs puisqu'il est toujours effectif même en présence de TSA (*trichostatin A*) un inhibiteur de HDACs. De plus, un mutant N-CoR délété pour son domaine d'interaction avec les HDACs présente aussi le même effet répresseur sur l'activité transcriptionnelle de AR. Les auteurs font alors l'hypothèse que N-CoR pourrait réprimer la transcription dépendante de AR en participant à une compétition avec des co-activateurs ou en altérant les interactions entre les domaines N et C terminaux de AR. Un rapport plus récent a permis de décrire plus en détail le mode de fonctionnement de N-CoR (Hodgson et al., 2005). En diminuant son niveau d'accumulation par une technique d'interférence ARN, les auteurs confirment le rôle de co-represseur de N-CoR et grâce à une immunoprécipitation de chromatine, ils mettent en évidence son recrutement sur le promoteur du gène *PSA* en réponse à la DHT. Ce résultat est néanmoins controversé par d'autres études montrant son recrutement en réponse à un antagoniste et non en réponse à un agoniste (Chen et al., 2004; Shang et al., 2002). Des expériences de double-hybride ont démontré que N-CoR ne s'opposait pas à l'interaction N/C de AR mais entrainait plutôt en compétition avec le recrutement de co-activateurs tels que SRC1 ou TIF2 (Berrevoets et al., 2004). Une étude de Fu et coll. semble néanmoins impliquer N-CoR dans un rôle de co-represseur de AR en participant à un complexe contenant HDAC1 (Fu et al., 2002). Ainsi, les co-répresseurs SMRT et N-CoR semblent contrôler la transcription dépendante des androgènes en se comportant comme des compétiteurs pour la fixation et l'activité de co-activateurs mais aussi en limitant l'interaction N/C de AR. On suppose ainsi qu'ils joueraient un rôle indirect sur la structure chromatinienne en limitant l'accès et ainsi l'action des régulateurs positifs de l'état chromatinien. Néanmoins, leur action directe par recrutement de HDACs n'est pas exclue. On pourrait ainsi penser qu'en absence d'hormone, ces protéines soient liées à AR mais aussi à l'ADN pour maintenir sa structure dans un état inactif. La liaison du ligand déplacerait les équilibres établis entre ces différents complexes et favoriserait le recrutement de co-activateurs modulant positivement la structure chromatinienne.



### Figure n°21: Mécanismes d'action du co-répresseur SHP

La protéine SHP (short heterodimer partner) exerce son effet inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes en interagissant avec lui et en inhibant son interaction avec des protéines co-activatrices telles que TIF2 ou FHL2 (A) mais aussi en participant à un complexe co-répresseur après le recrutement d'histones déacétylases et/ou de protéines telles que mSin3A (B). Ces différents mécanismes ne sont pas exclusifs et pourraient se mettre en place de façon alternative ou séquentielle.



### c. Le récepteur orphelin SHP.

La protéine SHP (*short heterodimer partner*) est un membre des récepteurs nucléaires et plus particulièrement de la classe des récepteurs orphelins. Cette protéine a été identifiée pour son interaction avec RXR mais elle interagit aussi avec de nombreux autres récepteurs nucléaires tels que ER, PXR, LRH-1, HNF4 ou AR (Gobinet et al., 2001; Johansson et al., 1999; Lee et al., 2000b; Ortlund et al., 2005; Ourlin et al., 2003; Seol et al., 1996). La structure de SHP est assez atypique car elle ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN mais a cependant un domaine potentiel de liaison du ligand qui présente une forte identité avec le récepteur nucléaire DAX-1.

L'étude de Gobinet et coll. a mis en évidence un effet inhibiteur de la protéine SHP sur l'activité transcriptionnelle de AR dans des cellules de mammifères (Gobinet et al., 2001). Cette interaction entre SHP et AR en absence et en présence de ligand implique les domaines N-terminaux et LBD de AR. L'interaction et la répression de SHP sur l'activité dépendante du domaine LBD de AR mettent en jeu une boîte de type LXXLL présente dans la portion centrale de SHP. De plus il semble exister une compétition entre les effets négatifs de SHP et les effets positifs de certains co-activateurs tels que TIF2 ou FHL2 (*four and half LIM domain 2 protein*) pour réguler l'activité transcriptionnelle de AR, suggérant un mode d'action similaire à celui de N-CoR ou SMRT (*figure n°21*). Dans la suite de leur étude, la même équipe de recherche a clairement attribué l'effet inhibiteur de SHP sur la transcription dépendante de AR au recrutement de HDAC1. En effet, les auteurs démontrent une interaction directe entre SHP et HDAC1, leur co-immunoprécipitation *in-vivo* et l'existence d'un complexe ternaire contenant AR, SHP et HDAC1. De plus, la répression de SHP sur AR peut-être fortement contrebalancée par l'utilisation du TSA (inhibiteur des HDACs) impliquant les HDACs dans l'effet de co-répresseur de SHP. Ainsi, les auteurs émettent l'hypothèse que SHP pourrait agir par deux mécanismes différents et séquentiels. Tout d'abord, SHP pourrait entrer en compétition avec des co-activateurs pour leur recrutement sur AR puis exercer un effet répresseur additif en recrutant des HDACs. L'effet négatif de SHP sur la structure chromatinienne pourrait être lié à sa capacité à recruter le co-répresseur mSin3A (*mammalian switch-independent 3 protein*) comme cela a été mis en évidence dans la répression du promoteur de CYP7A1 (*cholesterol 7 alpha hydroxylase*) (Kemper et al., 2004). En outre, les auteurs suggèrent que l'effet inhibiteur de SHP impliquant les HDACs pourrait aussi affecter la répression en modulant le niveau d'acétylation de AR (Gaughan et al., 2002).

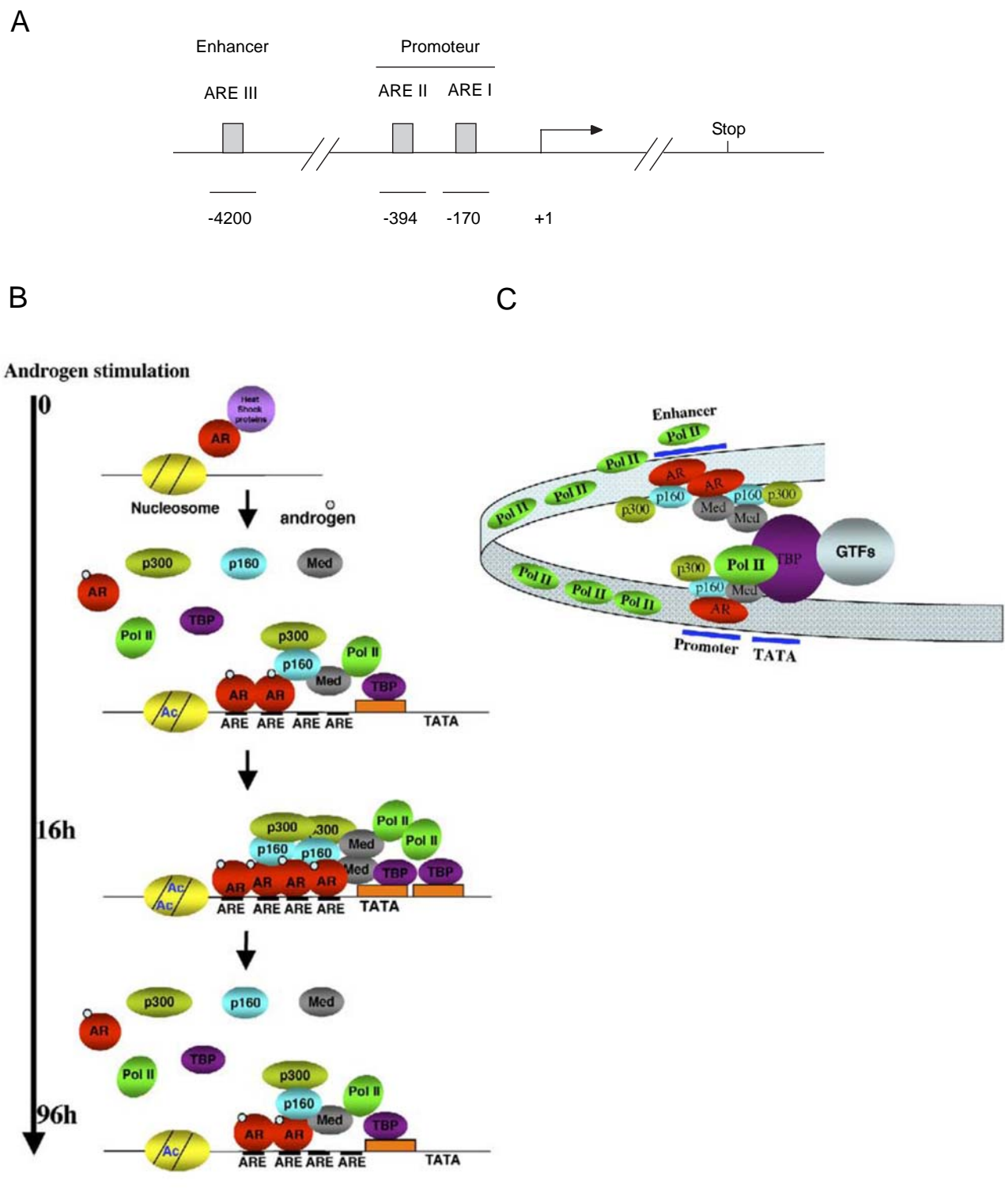


#### d. La protéine ARR19.

Dans une étude menée pour rechercher des gènes androgéno-régulés impliqués dans la spermatogenèse, Jeong et coll. ont identifié un clone correspondant à ARR19 (*androgen receptor corepressor 19kDa*) (Jeong et al., 2004). Ce gène code pour une protéine de 19kDa dont les messagers sont largement accumulés dans le testicule et à un niveau moindre dans la prostate et l'épidydime. Les auteurs montrent qu'en présence de ligand, les protéines AR et ARR19 interagissent spécifiquement et sont transloquées dans le noyau. De plus, la surexpression de ARR19 inhibe l'activité transcriptionnelle de AR et cette inhibition implique les HDACs puisque l'utilisation de TSA renverse cet effet. Le mode d'action de ARR19 est en fait lié au recrutement de HDAC4 puisque la surexpression de cette protéine amplifie l'effet inhibiteur de ARR19 et qu'il a été mis en évidence une interaction directe entre ARR19 et HDAC4. Enfin, une expérience d'immunoprécipitation de chromatine révèle le recrutement de AR, ARR19 et HDAC4 sur un promoteur contenant deux éléments de réponse aux androgènes et ceci en réponse aux androgènes. Le gène ARR19 ayant été identifié comme une cible potentielle des androgènes, ce mécanisme d'action pourrait être à l'origine d'un rétrocontrôle négatif de ARR19 sur AR par l'intermédiaire d'un effet négatif sur son activité transcriptionnelle. Un tel mécanisme a notamment été décrit pour RIP140 (*receptor interacting protein 140 kDa*) dont le messager et la protéine sont induits par l'acide rétinoïque et qui en retour régule négativement l'activité transcriptionnelle du récepteur de l'acide rétinoïque (Kerley et al., 2001).

#### 4. Coopération et association de AR et de ses co-régulateurs en complexes multi protéiques : exemple du promoteur du gène PSA.

L'antigène spécifique de la prostate PSA a largement été étudié en raison de sa qualité de gène cible des androgènes et de son rôle de marqueur de l'état tumoral de la prostate. En effet, chez l'homme ce gène code pour une sérine protéase de la famille des kallikréines synthétisés par les cellules épithéliales luminales de la prostate, sécrétée et mélangée au liquide séminal. Les variations du niveau de PSA sanguin utilisé dans le dépistage du cancer de la prostate font intervenir deux aspects : tout d'abord le niveau de production cellulaire mais aussi sa capacité à rejoindre la circulation sanguine. Dans le cas d'une prostate saine, le PSA ne diffuse que très peu dans le sang. Si les hyperplasies bénignes de la prostate sécrètent dix fois plus de PSA,



**Figure n°22: Représentation schématique du promoteur du gène PSA et de la formation du complexe activateur de la transcription.**

A. Le promoteur du gène PSA contient deux éléments de réponse aux androgènes proximaux (ARE I et II) qui constituent le promoteur et plusieurs ARE distaux regroupés sous le terme d'ARE III et qui constituent l'*enhancer*.

B. Cinétique de recrutement de AR et des protéines du complexe activateur de la transcription en réponse à la stimulation androgénique. Le recrutement de AR et des protéines associées augmente durant les 16 premières heures de stimulation hormonale, puis diminue progressivement.

C. Modèle de coopération entre l'*enhanceur* et le promoteur du gène PSA par repliement de l'ADN et glissement de l'ARN POL II de l'*enhanceur* vers le promoteur. D'après Wang et Brown, 2005.

AR, androgen receptor; Med, mediateur; Pol II, ARN polymérase II, TBP, TATA binding protein; Ac, groupement acétyl; ARE, androgen response element; GTFs, facteurs généraux de la transcription.

elles ne le laissent aussi que peu passer dans le sang. En revanche, des cellules néoplasiques sécrètent le PSA en quantité identique à des cellules saines, mais la déstructuration du tissu qu'elles imposent augmente de façon drastique sa diffusion dans la circulation sanguine. Une augmentation de son niveau sanguin est donc corrélée à une transformation tumorale de la prostate.

Sur le promoteur du gène PSA ont été identifiés trois éléments de réponse aux androgènes ARE (*figure n°22.A*). Les ARE I et II situés respectivement en -170 et -394 sont dénommés promoteur alors qu'une autre région située en -4200 contenant plusieurs ARE regroupés sous le terme d'ARE III est dénommée *enhancer* (Cleutjens et al., 1997). Afin d'étudier le recrutement des facteurs généraux de la transcription, des modulateurs de la structure chromatinienne, des partenaires de AR et de AR lui-même, de nombreuses études d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées. Elles ont permis, dans un contexte cellulaire, d'apprécier la coopération des co-régulateurs de AR recrutés sur l'ADN mais aussi leur cinétique de recrutement et de mieux appréhender la complexité de la régulation transcriptionnelle.

Deux travaux majeurs ont mis en évidence le recrutement de AR, de ses co-régulateurs et de l'ARN POL II sur le promoteur du gène *PSA* (Kang et al., 2004b; Shang et al., 2002). Les auteurs montrent que dans des cellules LNCaP, une induction de deux heures par la DHT induit un recrutement sur le promoteur et l'*enhancer* de AR (plus important sur l'*enhancer*), de l'ARN polymérase II, des co-activateurs GRIP1, p300 en association avec une acétylation des histones H3, et de CARM1 en association avec une méthylation de l'arginine 17 de ces mêmes histones. En revanche, le rapport de Shang et coll. et celui de Kim et coll. présentent des résultats différents quant au recrutement de l'histone H3 dont la lysine 4 est di- ou triméthylée (Kim et al., 2003). Cette induction par l'hormone ne se traduit en revanche que par une présence légèrement plus faible de SMRT et N-CoR sur le promoteur du gène *PSA* mais non sur son *enhancer*. Une autre étude étudiant la dynamique rapide d'association de ces complexes sur l'ADN met en évidence un recrutement cyclique de AR, de l'ARN POL II, de CBP et de GRIP1 ainsi que du niveau d'acétylation des histones H3 (Kang et al., 2002b). En effet, le premier acteur à être recruté sur le promoteur du gène *PSA* est AR après 15 minutes de stimulation à la DHT, vient ensuite l'ARN POL II puis les co-activateurs CBP et GRIP1. Ces protéines vont ensuite se libérer de façon séquentielle du promoteur et reconduire un autre cycle avec la même dynamique de fixation. La durée de ces cycles a été évaluée à environ 90 minutes. Ce même phénomène cyclique a été étudié et décrit de façon très détaillée et élégante pour le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  (Metivier et al., 2003). Ce modèle inclut de plus les

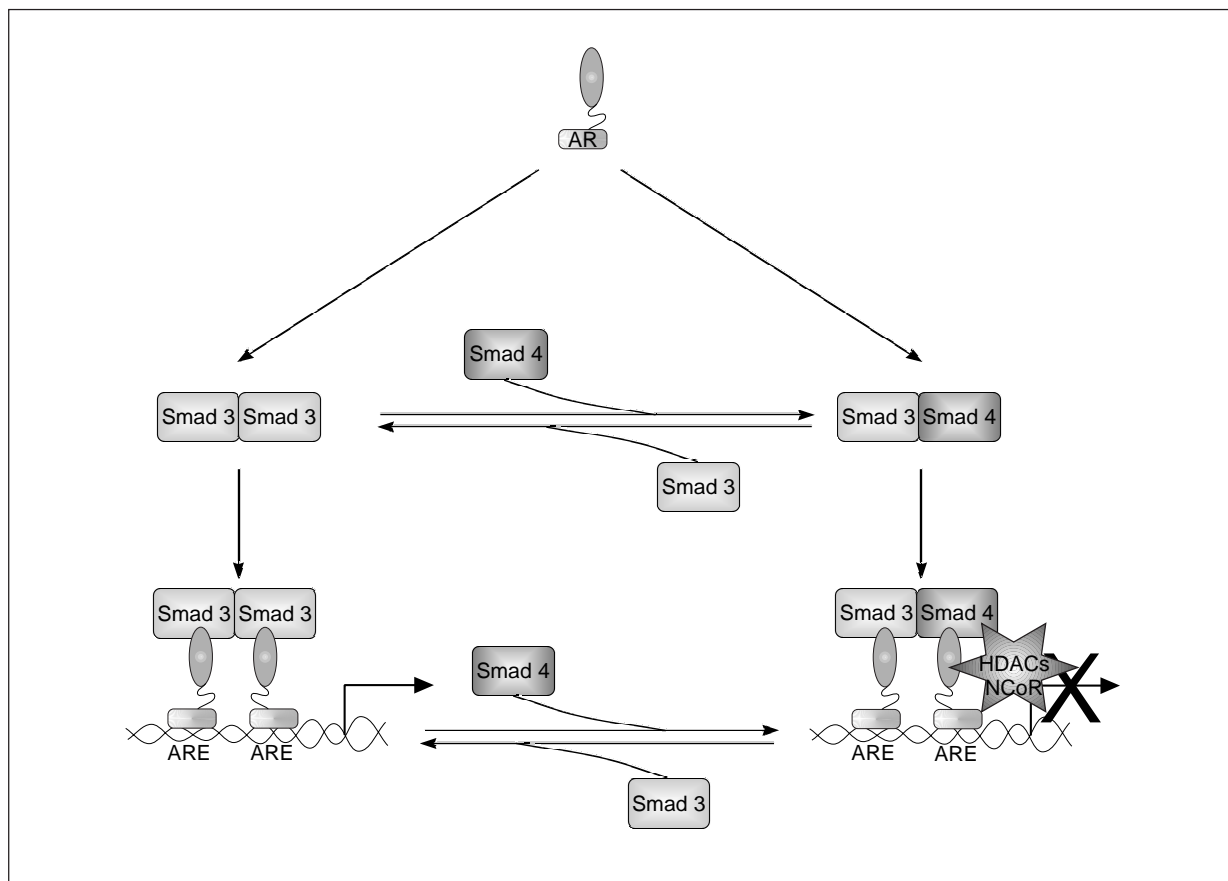


protéines SWI/SNF et les implique dans le remodelage de la chromatine nécessaire à la fixation de l'ARN POL II. De plus, la fin des cycles serait régulée par une action directe de HSP70 tel que cela a été proposé pour le recyclage de GR sur son promoteur (Freeman and Yamamoto, 2002). Il est à noter que HSP70 est recruté sur le promoteur et l'*enhancer* du gène *PSA* en réponse à l'hormone (Shatkina et al., 2003). On suppose ainsi que la fixation de AR à son ARE engendre une série de réactions en chaîne guidées par les affinités relatives des différentes protéines et autorise le recrutement de l'ARN POL II. Selon l'étude de Wang et coll. le recrutement du récepteur, de ses différents partenaires et de l'ARN POL II s'effectue progressivement en réponse à l'hormone jusqu'à atteindre un maximum après 16 heures de stimulation, puis diminue progressivement (Wang et al., 2005) (**figure n°22.B**).

Dans ce processus, semble majoritairement impliqué un autre complexe médiateur incluant la protéine TRAP 220 (*human thyroid hormone receptor-associated protein*) qui interagit avec AR, qui est recrutée sur le promoteur du *PSA* en réponse à la DHT et qui jouerait un rôle de pont entre les différents co-activateurs et l'ARN POL II (Wang et al., 2005; Wang et al., 2002). La fixation des co-activateurs de type SRC1 permettrait le recrutement de CBP/p300, pCAF ou encore CARM1 qui, par remodelage de la structure chromatinienne, autoriseraient l'initiation et l'élongation de la transcription. On suppose que la cyclicité de ces interactions permet un contrôle précis de la transcription avec une possibilité rapide de mettre fin au processus. Cette cyclicité pourrait entre autre être régulée par la phosphorylation de AR et de ses co-facteurs.

En revanche, l'incubation de cellules LNCaP avec l'anti-androgènes bicalutamide se caractérise aussi par un recrutement de AR, SMRT, N-CoR, des HDAC1/2 sur le promoteur (ARE I et AREII) (Shang et al., 2002). L'ensemble de ces protéines participe à la formation d'un complexe répresseur s'opposant au recrutement de l'ARN POL II (Kang et al., 2002b).

Enfin, les études de Shang et coll. et celle de Wang et coll. permettent de décrire un modèle de coopération entre le promoteur et l'*enhancer* du gène *PSA* pourtant séparés de 4000 bases. Ce modèle est basé d'une part sur le repliement de l'ADN qui autoriserait une interaction directe entre les protéines liées au promoteur et à l'*enhancer* (p160, p300, TRAP 220) qui, de façon coordonnée, participeraient à la formation du complexe activateur de la transcription. D'autre part, il semble aussi qu'il existe une communication entre le promoteur et l'*enhancer* via le glissement de l'ARN POLII de l'*enhancer* vers le promoteur. En effet, en réponse aux androgènes on observe une induction forte du recrutement de l'ARN POLII au niveau de la région comprise entre le promoteur et l'*enhancer*, même si la valeur absolue reste bien inférieure à celle mesurée sur le promoteur et l'*enhancer*. De plus, le recrutement de l'ARN



**Figure n°23: Mode d'action des protéines Smad3/4 sur l'activité du récepteur des androgènes.**

Les facteurs de transcription Smad 3 et 4 présentent tous deux une affinité pour le récepteur des androgènes. En fonction de leur disponibilité, il s'établit au niveau de l'ADN un complexe activateur de la transcription dépendant des androgènes lorsque AR est uniquement lié à Smad3 ou bien un complexe répresseur lorsque Smad4 est présent dans le complexe. Cet effet répresseur pourrait passer par le recrutement de HDACs, de N-CoR ou encore mSin3A. Smad, human Sma and Mad homolog; HDAC, histone déacétylase; N-CoR, nuclear receptor corepressor; mSin3A, mammalian switch-independent 3 protein.



POL II est observé séquentiellement sur l'*enhancer*, la région intermédiaire et le promoteur. Enfin, l'activité luciférase d'un gène rapporteur dirigé par le promoteur du *PSA* est fortement diminuée en réponse à l'hormone lorsque des régions insultrices sont placées entre le promoteur et l'*enhancer*. Le modèle d'intégration de ces deux mécanismes de coopération est représenté dans la **figure n°22.C** (Shang et al., 2002; Wang et al., 2005).

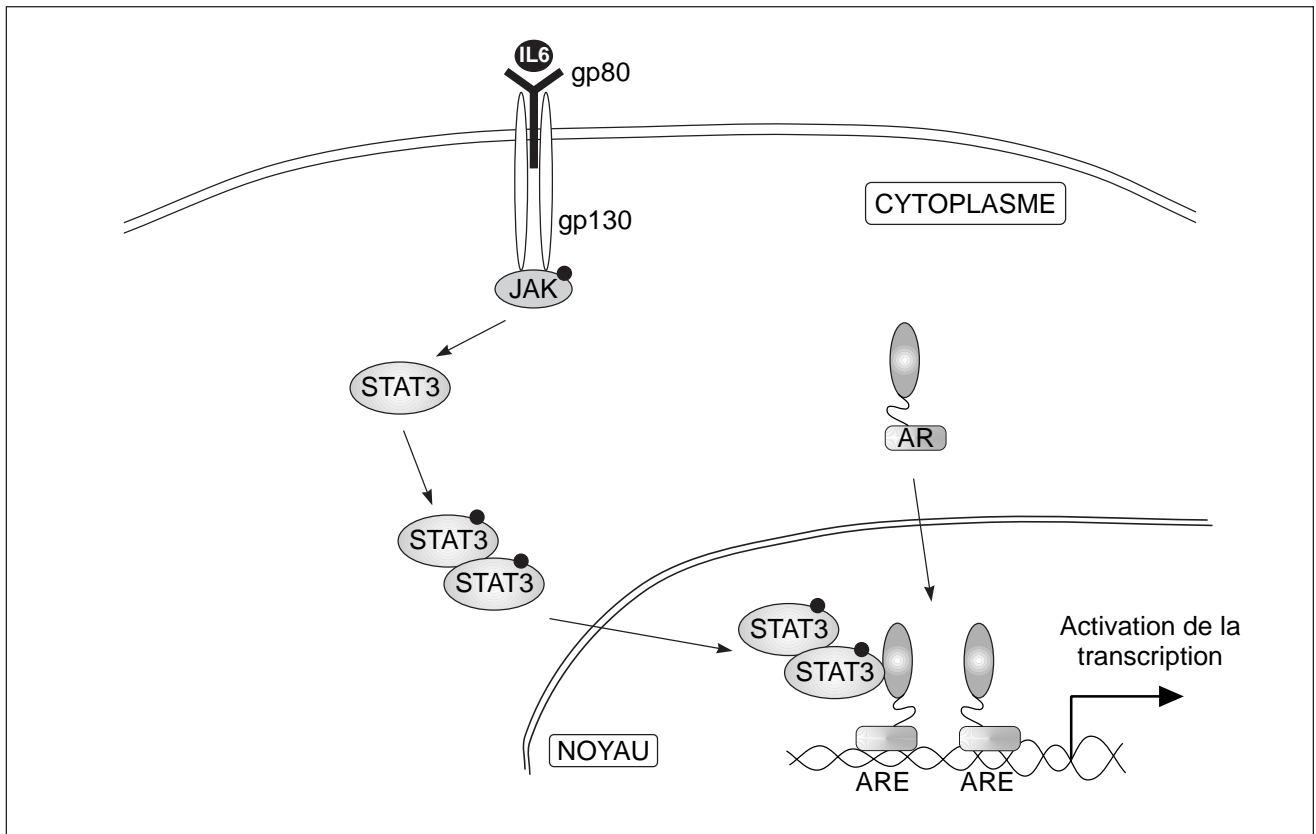
### **C. L'activité du récepteur des androgènes est contrôlée par différents acteurs de la signalisation et du cycle cellulaire.**

#### **1. Acteurs de la signalisation cellulaire.**

Pour illustrer la modulation de l'activité transcriptionnelle de AR par des protéines de signalisation cellulaire, nous prendrons l'exemple de Smad3/4 et de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) qui sont des facteurs de transcription activés par des facteurs de croissance. Nous étudierons aussi le rôle controversé de la protéine kinase AKT/PKB, effecteur de la voie PI3K, sur l'activité de AR.

##### **➤ Les facteurs de transcription Smad3/4.**

Les protéines Smads sont au nombre de huit chez l'homme et la souris. Ce sont des facteurs de transcription activés par le facteur de croissance TGFβ (*transforming growth factor β*) et les membres de sa famille dont les BMPs (*bone morphogenetic proteins*) ou encore l'AMH. Lorsque Smad3 est phosphorylé par le récepteur du TGFβ, il s'associe à Smad4 pour transloquer dans le noyau et activer de très nombreux gènes cibles (Massague et al., 2005). Une étude de Kang et coll. a permis de montrer que l'activité transcriptionnelle de AR en réponse à la DHT était augmentée dans des cellules de cancer prostatique par le TGFβ (Kang et al., 2001). Cet effet est en fait dépendant de l'effecteur aval Smad3 qui interagit *in-vivo* avec AR et dont la surexpression augmente la transcription dépendante des androgènes sur des gènes rapporteurs mais aussi sur le gène endogène *PSA* dans des cellules LNCaP. Dans un travail ultérieur, il a été démontré qu'il existe en fait une compétition entre Smad3 et Smad4 (Kang et al., 2002a). En effet, Smad4 présente une affinité plus grande que Smad3 pour AR et



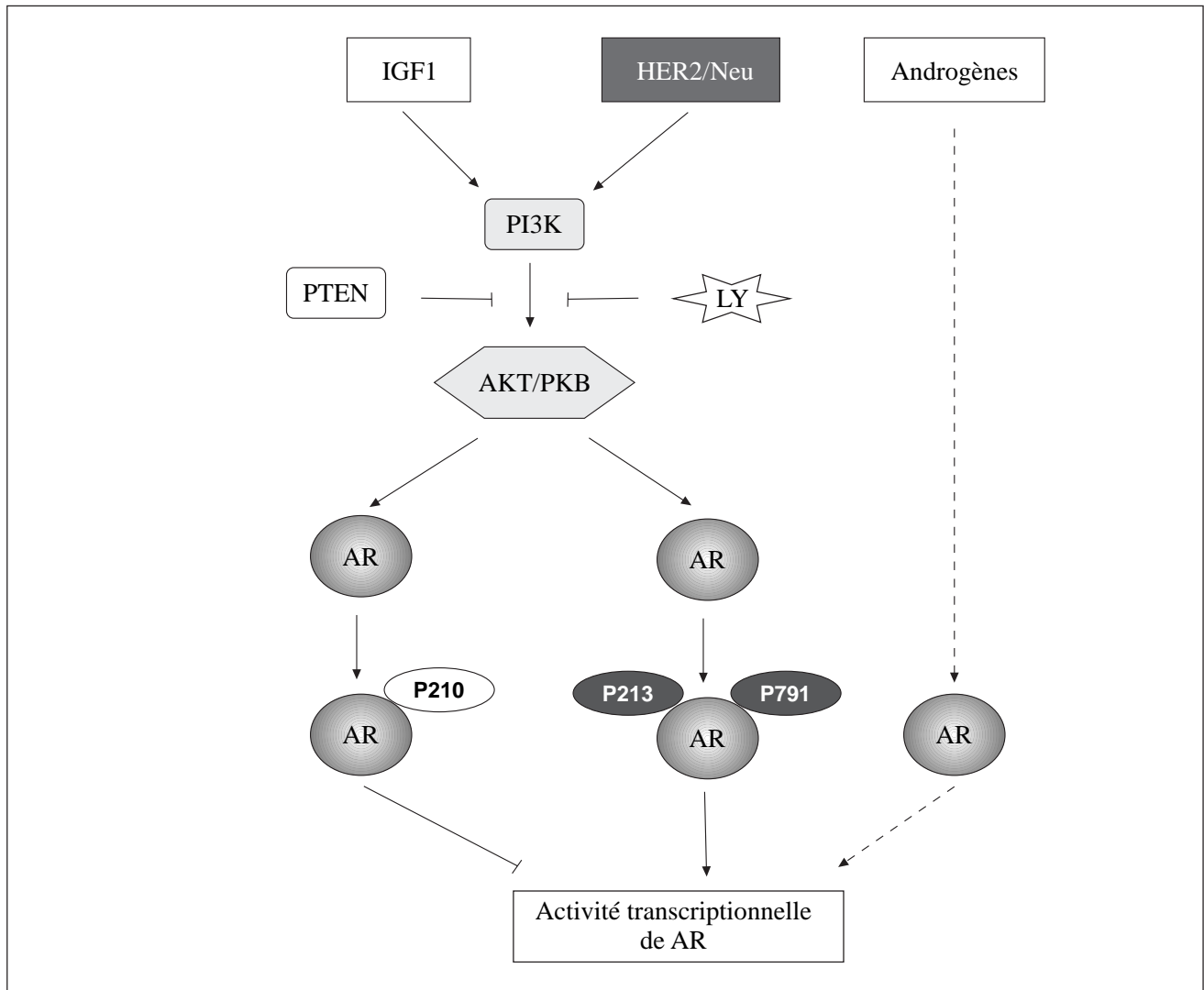
**Figure n°24: Mécanisme d'activation du récepteur des androgènes par l'interleukine 6.**

La fixation de l'interleukine 6 (IL6) à son récepteur entraîne une activation des kinases JAKs par phosphorylation. Ces dernières peuvent alors phosphoryler et activer les facteurs de transcription STAT3 qui s'homodimérisent et transloquent dans le noyau. A ce niveau, ils peuvent interagir avec le récepteur des androgènes et initier la transcription des gènes cibles de AR indépendamment de la présence de son ligand. JAKs, Janus Kinases; STAT, signal transducer and activators of transcription.

peut réprimer son effet positif sur l'activité de AR. Alors que la transfection de Smad3 seule augmente le niveau d'acétylation de AR, la co-transfection de Smad4 diminue ce niveau, suggérant un rôle direct des HDACs sur AR dans le mode d'action de Smad3 et Smad4. Cette hypothèse est confirmée par l'effet inhibiteur du TSA sur la répression par Smad4. Ainsi, Smad3/4 pourraient recruter un complexe comprenant des HDACs mais aussi mSin3A ou N-CoR tel que cela a pu être mis en évidence (Kim and Lassar, 2003). Un équilibre s'établirait en fonction de la disponibilité de Smad3 et Smad4 pour la formation d'un complexe activateur ou répresseur (**figure n°23**). Un autre travail a fourni des résultats opposés quant à l'effet de Smad3 (Hayes et al., 2001). Ces données contradictoires obtenues à partir de systèmes cellulaires différents (cellules naïves CV1) illustrent les observations de Kang et coll. selon lesquelles l'effet de Smad3 est dépendant du contexte cellulaire d'une part et du promoteur d'autre part.

➤ Le facteur de transcription STAT3.

L'interleukine 6 (*IL6*) est une cytokine qui régule entre autres les réponses immunitaires ou inflammatoires et qui agit aussi comme un facteur de croissance sur différents types de tumeurs et notamment le cancer de la prostate (Okamoto et al., 1997; Siegsmond et al., 1994). La fixation de l'*IL6* à son récepteur gp80 active en cascade les sous-unités associées gp130, les JAKs (*janus kinases*), la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription STAT3. Cette phosphorylation entraîne sa translocation nucléaire et sa fixation à l'ADN sur lequel il agit en tant que facteur de transcription homo-dimérique. Une étude de Matsuda et coll. rapporte que l'*IL6* potentialise la transcription d'un gène cible endogène, la kallikréine 4 en réponse aux androgènes (Matsuda et al., 2001). Cet effet met en jeu une interaction démontrée *in-vitro* et *in-vivo* entre STAT3 et AR qui est augmentée en présence de DHT (**figure n°24**). L'implication de STAT3 est par ailleurs confirmée par l'abolition de l'effet de l'*IL6* après transfection d'un dominant négatif de STAT3 dans des cellules LNCaP (Ueda et al., 2002). De plus, les auteurs montrent que l'*IL6* augmente l'interaction entre AR et STAT3. L'*IL6* stimule aussi l'activité transcriptionnelle de AR indépendamment de la présence des androgènes (Chen et al., 2000). En effet, l'*IL6* à elle seule active un gène rapporteur contenant des AREs en absence de DHT dans des cellules LNCaP et l'ajout de la DHT produit un effet synergique. Si l'implication directe de STAT3 est révélée par l'utilisation d'un dominant négatif de STAT3 qui inverse l'effet de l'*IL6*, l'interaction entre AR et STAT3 est *IL6*-dépendante mais androgéno-indépendante. L'ensemble de ces résultats suggère que le facteur de croissance *IL6*



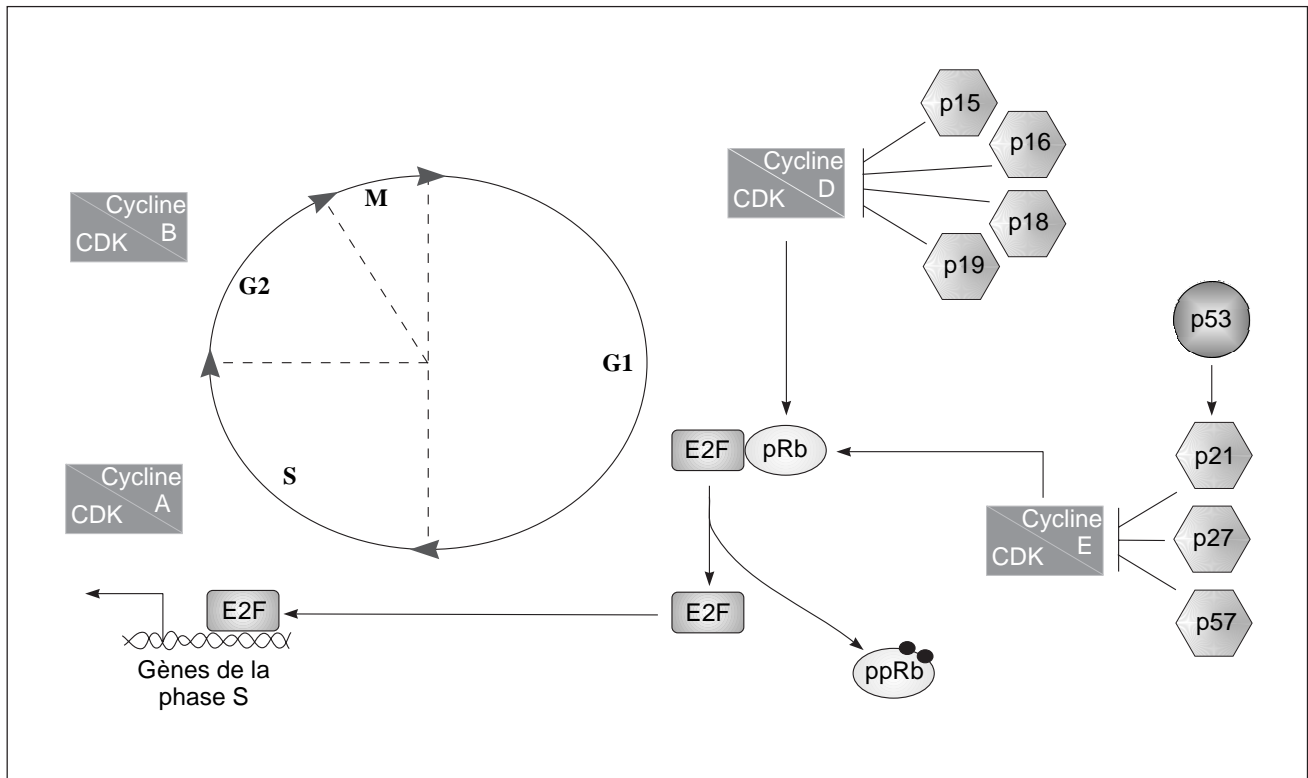
**Figure n°25: La protéine AKT/PKB régule différemment l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes.**

La fixation du facteur de croissance IGF1 (*insulin like growth factor 1*) à son récepteur membranaire active la voie de la PI3Kinase, ce qui se traduit par une phosphorylation de AR par la protéine AKT au niveau de son résidu sérine 210 et une inhibition de son activité transcriptionnelle. Cet effet peut être renversé par l'utilisation de l'inhibiteur LY294002. En revanche, le récepteur membranaire Her2/neu peut également activer la protéine AKT, induire la phosphorylation de AR sur les résidus sérine 213 et sérine 791 et ainsi induire son activité transcriptionnelle. PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; PI3K, Phosphoinositid-3-OH Kinase.

induit une activation de STAT3, qui par son interaction avec AR, pourrait réguler son activité transcriptionnelle aussi bien en l'absence qu'en présence d'androgènes. Cette activation représente une des causes possibles de la croissance des tumeurs prostatiques en échappement thérapeutique. Cet aspect sera abordé dans la troisième partie de la bibliographie. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu dans ces deux aspects de régulation transcriptionnelle sont encore peu connus.

➤ La protéine AKT/PKB.

La PI3K est une protéine membranaire composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Cette protéine à activité lipide kinase peut être activée par la fixation de facteurs de croissance tels que l'IGF1 à son récepteur. Cette activation se traduit par la formation de phosphoinositides actifs, qui à leur tour, peuvent activer la sérine-thréonine kinase AKT (Osaki et al., 2004). La voie de la PI3K est impliquée dans les phénomènes de prolifération, de croissance et de survie cellulaire. Une étude de Lin et coll. a mis en évidence un effet répresseur de AKT sur l'activité transcriptionnelle de AR (Lin et al., 2001) (*figure n°25*). En effet, les auteurs montrent que AKT se lie directement à AR dans des cellules tumorales prostatiques DU145 et induisent sa phosphorylation sur le résidu sérine 210 en réponse à l'IGF1. Cet effet est dépendant de la PI3K puisqu'un inhibiteur de la voie (LY294002) s'oppose à cette phosphorylation. La surexpression d'un mutant de AKT constitutionnellement actif inhibe l'activité transcriptionnelle de AR sauvage et non d'un AR muté pour le site de phosphorylation S210A sur un gène rapporteur. L'implication de la PI3K est confirmée par l'effet activateur du LY294002 ou d'un mutant p85 de l'activité transcriptionnelle de AR. Le mécanisme d'action de la protéine AKT semble être lié à son effet inhibiteur sur l'interaction entre AR et différents co-activateurs tels que ARA70, ARA54 ou encore TIF2. Les auteurs montrent enfin que l'activation de AKT dans des cellules prostatiques PC3 surexprimant AR prévient l'apoptose induite par un traitement avec des androgènes, notamment en prévenant l'induction d'un gène androgéno-dépendant impliqué dans la régulation négative du cycle cellulaire : p21<sup>Cip1</sup>. Cet effet inhibiteur de AKT sur l'activité transcriptionnelle de AR pourrait également être conduite par une dégradation ciblée de AR par le protéasome suite à sa phosphorylation par AKT (Lin et al., 2002). D'autres travaux concluent à des effets opposés ; l'activation de la protéine AKT par le récepteur membranaire HER2/neu se traduit par une phosphorylation de AR sur les résidus sérine 213 et sérine 791 et une induction de son activité transcriptionnelle (Wen et al., 2000). De plus,



**Figure n°26: Protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire.**

Le cycle cellulaire se compose de deux phases de transition G1 et G2, d'une phase S au cours de laquelle est répliqué l'ADN et d'une phase de mitose durant laquelle une cellule mère donne naissance à deux cellules filles. La transition G1-S est hautement régulée et dépendante de la disponibilité du facteur de transcription E2F. En début de phase G1, ce dernier est lié à la protéine du rétinoblastome Rb, ce qui bloque son activité. La phosphorylation successive de Rb par les complexes cycline/CDK (cyclin dépendant kinase) autorise la libération de E2F et la transition G1-S. Deux familles de CKI (CDK inhibitor) s'opposent à l'activité des complexes cycline/CDK: la famille INK4 composée de p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup> et la famille des Cip/Kip composée de p21<sup>Cip1</sup>, de p27<sup>Kip1</sup> et de p57<sup>Kip2</sup>. De plus le suppresseur de tumeur p53 peut contrôler la progression dans le cycle en réponse à des dommages cellulaires en induisant la transcription de p21<sup>Cip1</sup>. Cip, cyclin inhibitory protein; Kip, kinase inhibitory protein; INK4, inhibitor of CDK4.

l'étude de Manin et coll. montre que dans des cellules saines différenciées et des cellules tumorales, le niveau d'accumulation de AR est corrélé à l'activation de la voie PI3K puisque le taux de AR est fortement réduit en présence d'un inhibiteur de la PI3K ou d'un dominant négatif de AKT (Manin et al., 2002). Ceci se traduit par une diminution de l'activité transcriptionnelle du récepteur en présence du dominant négatif de AKT. Ces différences observées peuvent provenir des systèmes cellulaires et des constructions utilisées.

L'ensemble de ces études confirme ainsi la complexité de la régulation transcriptionnelle initiée par les androgènes et place AR au cœur de nombreuses voies de signalisation cellulaires.

## 2. Acteurs du cycle cellulaire.

En plus de la régulation de son activité transcriptionnelle par son interaction avec des protéines impliquées dans différentes voies de signalisation cellulaire, le récepteur des androgènes interagit aussi avec des acteurs majeurs du cycle cellulaire (*figure n°26*).

En effet, la protéine du rétinoblastome Rb ou encore la cycline E ont toutes les deux été montrées comme étant des co-activateurs du récepteur des androgènes dans des cellules cancéreuses de la prostate (Yamamoto et al., 2000; Yeh et al., 1998). Le suppresseur de tumeur Rb est un des acteurs centraux du cycle cellulaire puisqu'il est directement responsable de la disponibilité du facteur de transcription E2F dont l'activation est suffisante pour l'entrée des cellules en phase S du cycle. Le récepteur des androgènes et la protéine Rb interagissent *in-vivo* de façon androgéno-indépendante et une surexpression de Rb augmente de façon dose-dépendante l'activité de AR, effet qui s'additionne à celui d'un autre co-activateur de AR, la protéine ARA70. La cycline E joue un rôle important dans le cycle cellulaire par son association avec les kinases CDK2 et CDK4 (*cyclin dependant kinase*) qui phosphorylent la protéine du rétinoblastome pour autoriser les cellules à entrer dans le cycle en phase S. De façon intéressante, les auteurs montrent que l'action activatrice de la cycline E sur l'activité transcriptionnelle de AR est indépendante de l'activité kinase de CDK2 puisqu'un mutant de la cycline E ne liant plus CDK2 exerce le même effet activateur. Le mode d'action de la cycline E n'est pas encore déterminé bien qu'il passe par son interaction directe avec le domaine amino-terminal de AR.

En revanche, d'autres protéines du cycle cellulaire se comportent comme des co-répresseurs de AR. La cycline D1 présente la capacité de lier AR et de réprimer son activité

	Co-régulateurs positifs	Co-régulateurs négatifs
Protéines modulant le niveau d'accumulation de AR	HSP 90	CHIP PTEN
Protéines modulant le transport cytosol-noyau de AR	Filamine A HSP 90	DAX-1 ARA 67
Protéines modulant l'état de la chromatine	SWI/SNF p160/SRC CBP/p300 pCAF CARM1	HDAC1 SMRT/N-CoR SHP ARR19
Protéines de signalisation	Smad 3, STAT 3, AKT	AKT
Protéines du cycle cellulaire	Rb cycline E	Cycline D1 p53

**Figure n°27: Synthèse des différents co-régulateurs de AR étudiés.**

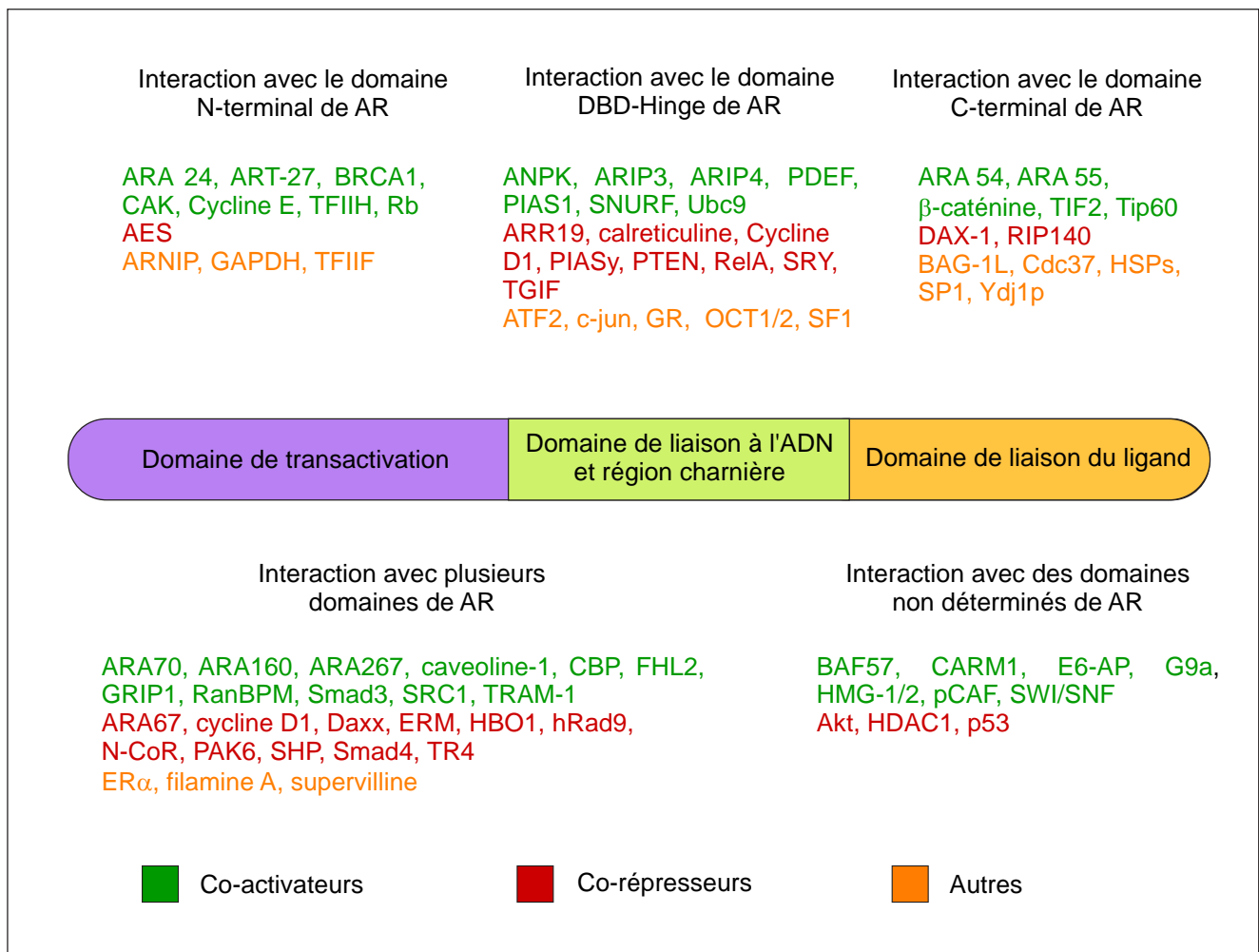
HSP 90: Heat Shock Protein 90 kDa; CHIP: Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein; PTEN: Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10; DAX-1: Dosage-sensitive Adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1; SWI/SNF: switch/sucrose nonfermenting; CBP: CREB binding protein; CARM1: coactivator-associated arginine methyltransferase 1; HDAC1: histone deacetylase 1; SMRT/N-CoR: silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors/nuclear receptor corepressor; SHP: short heterodimer partner; ARR19: androgen receptor corepressor 19kDa; STAT3: signal transducer and activators of transcription 3; Rb: retinoblastoma protein.



transcriptionnelle de façon indépendante de son implication dans le cycle cellulaire (Knudsen et al., 1999). Les auteurs font l'hypothèse que la cycline D1 participerait à un rétro-contrôle négatif dans des cellules LNCaP androgéno-dépendantes. Ainsi, l'activation de AR par les androgènes augmenterait le taux de cycline D1 (Knudsen et al., 1998), ce qui favoriserait la prolifération des cellules par son action dans le cycle d'une part et atténuerait l'activité transcriptionnelle de AR d'autre part. Cette même équipe a aussi démontré que l'effet inhibiteur de la cycline D1 était dominant par rapport aux effets co-activateurs de SRC1, p300, pCAF ou ARA 70 et était en partie dépendant de l'activité des HDACs (Petre et al., 2002). De plus, les auteurs démontrent qu'une surexpression de la cycline D1 dans des cellules LNCaP androgéno-dépendantes inhibe leur croissance, renforçant l'hypothèse du double jeu de la cycline D1. Un autre acteur clef du cycle cellulaire, le suppresseur de tumeur p53 souvent retrouvé muté et surexprimé dans le cancer de la prostate est aussi un régulateur négatif de l'activité transcriptionnelle de AR (Shenk et al., 2001). Il exerce son activité répressive en inhibant l'interaction N/C de AR et sa liaison à l'ADN. Néanmoins, l'interaction entre ces deux protéines n'a pas été mise en évidence. Un mutant p53 retrouvé dans des métastases de nœuds lymphatiques et issues d'un cancer de la prostate, ne possède plus d'activité co-répressive. Les auteurs suggèrent que l'agressivité de telles cellules pourrait être due à l'incapacité des mutants p53 à réprimer la transcription dépendante des androgènes. Une autre étude plus récente confirme le rôle de co-répresseur de p53 induit ou surexprimé dans des cellules LNCaP (Cronauer et al., 2004). Néanmoins, les auteurs montrent que dans des cellules prostatiques tumorales LNCaP et CWR22Rv1, l'inhibition de p53 lorsqu'il est à un niveau basal, se traduit aussi par une perte de l'activité transcriptionnelle et d'une diminution du niveau protéique de AR. Ainsi, il y aurait une balance entre les niveaux de AR et p53 dont la dérégulation pourrait se mettre en place au cours de la progression tumorale.

#### **D. Autres partenaires de AR.**

Dans ce chapitre, nous venons de présenter un certain nombre de co-régulateurs du récepteur des androgènes et le mode d'action de ces protéines. Nous avons vu que l'interaction de AR avec ses partenaires, peut moduler son activité de facteur de transcription par la mise en jeu de différents mécanismes (*figure n°27*). De plus, ces modulations peuvent être de nature à activer ou plutôt à réprimer son pouvoir transcriptionnel. Il faut toutefois noter que ce chapitre n'est pas une revue exhaustive des co-régulateurs de AR. De nombreuses autres protéines



**Figure n°28: Liste non exhaustive de protéines interagissant avec AR.**

ARA, AR-associated protein; AES, amino-terminal enhancer of split; ANPK, AR-interacting nuclear protein kinase; ARIP4, AR-interacting protein 4; ARNIP, AR N-terminal interacting protein; ARR19, androgen receptor corepressor-19 kDa; ART-27, AR trapped clone 27; ATF2, activation transcription factor 2; BAF57, BAG-1L, BAG-1 long; BRG1 associated factor 57; BRCA1, breast cancer susceptibility gene 1; CAK, CDK activating kinase; CARM1, coactivator-associated arginine methyltransferase 1; CBP, CREB-binding protein; DAX1, dosage-sensitive adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1; Daxx, death domain associated protein; E6-AP, E6-associated protein; ERM, ets family member; ERα, estrogen receptorα, FHL2, four and a half LIM-only protein 2; G9a, histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; GR, glucocorticoid receptor; HBO1, histone acetyltransferase binding to the origin recognition complex 1; HDAC1, histone deacetylase 1; HMG-1/2, high mobility group 1/2; HSPs, heat shock proteins; GRIP1, glucocorticoid receptor-interacting protein 1; N-CoR; nuclear receptor corepressor; OCT1/2, octamer transcription factors 1/2; PAK6, p21-activated kinase 6; pCAF, p300/CBP associated factor; PDEF, prostate derived Ets factor; PIAS, protein inhibitor of activated STA3; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; RanBPM, Ran binding protein in microtubule organising centre; Rb, retinoblastoma protein; RIP140, receptor interacting protein 140 kDa; SF1, steroidogenic factor 1; SHP, short heterodimer partner; Smad, human Sma and Mad homolog; SNURF, small nuclear RING finger protein; SP1, specific protein 1; SRC, steroid receptor co-activator; SRY, sex determining region Y; SWI/SNF, switch/sucrose nonfermenting; TFIIF, transcription factor II; TGIF, 5'TG3' interacting factor; TIF2, transcriptional intermediary factor 2; Tip60; Tat-interactive protein 60 kDa; TR4, testicular orphan receptor 4; TRAM1, thyroid hormone receptor activator molecule; Ubc9, ubiquitin-conjugated enzyme homologue; Ydj1, yeast DNAJ 1.

interagissant avec AR et modulant sa capacité à activer la transcription ont en effet été identifiées (*figure n°28*).

La plupart des études réalisées et citées précédemment ont été menées dans un contexte de cellules isolées, clonées et la plupart du temps tumorales. De plus, les outils utilisés tels que la transfection massive de plasmides codant pour l'ensemble de ces acteurs ou encore l'utilisation de gènes rapporteurs synthétiques ne traduit pas toujours les équilibres protéiques intra-cellulaires ou le contexte des promoteurs naturels. Plusieurs rapports mentionnent en effet des résultats différents en fonction des méthodes utilisées comme nous l'avons souligné. Des techniques plus récentes telles que l'immunoprécipitation de chromatine représentent de nouvelles approches plus physiologiques pour ce qui est du contrôle de l'activité transcriptionnelle de AR au niveau même de l'ADN et ouvrent de nouveaux concepts sur la dynamique des interactions protéiques. Le modèle animal, permettant entre autre l'invalidation ciblée d'acteurs clefs, est un outil qui intègre la signalisation androgénique non plus à l'échelle cellulaire mais à l'échelle du tissu et de l'organisme tout entier. Ainsi, il permet d'appréhender de façon plus large et physiologique la portée des interactions entre AR et ses partenaires sur l'étendue de l'action des androgènes.

Les mécanismes d'action décrits dans cette étude pour le récepteur des androgènes ne s'appliquent pas de façon systématique aux autres récepteurs stéroïdiens. En effet, si la régulation de la transcription dépendante des hormones stéroïdes semble être basée sur un schéma général, chacun des récepteurs est régulé spécifiquement par des partenaires qui lui sont propres. Ainsi, certains co-activateurs de AR pourront se comporter comme des co-répresseurs pour un autre récepteur stéroïdien ou inversement. De plus, la distribution tissulaire et l'affinité relative des co-régulateurs pour certains récepteurs sont à la base de la spécificité de réponse aux différents ligands.

Enfin, il faut aussi mentionner l'implication de ces partenaires dans certaines pathologies associées au récepteur des androgènes. Cet aspect sera abordé plus en détail dans la troisième partie de cet exposé.



### **III. Implication des androgènes dans la physiopathologie.**

Dans la première partie de cette étude, nous avons pu apprécier le rôle clef des androgènes dans un certain nombre de processus physiologiques. Ces hormones sont en effet largement impliquées dans les différents stades du développement mais sont aussi nécessaires au maintien de grandes fonctions de l'organisme et en particulier la fonction reproductrice mâle. Le récepteur des androgènes est l'acteur central de la signalisation androgénique puisqu'il est le médiateur qui établit la connexion fonctionnelle entre le signal hormonal et la réponse cellulaire. Ainsi, des anomalies de structure du récepteur des androgènes ou encore les dérégulations de son mode de fonctionnement sont associées à diverses pathologies. Dans ce chapitre, nous aborderons les causes et les conséquences des syndromes de l'insensibilité aux androgènes (*AIS*), de la maladie de Kennedy et du cancer de la prostate. Si les désordres à l'origine des AIS et de la maladie de Kennedy sont désormais assez bien connus, ceux à l'origine du cancer de prostate présentent un caractère multiple et non exclusif. De plus, il existe aussi une grande complexité des dérégulations impliquées dans son évolution. Nous tâcherons ainsi dans un deuxième temps d'appréhender le cancer de la prostate sur un plan moléculaire pour mieux évaluer la complexité de cette pathologie.

#### **A. Les pathologies associées à AR.**

##### **1. Les insensibilités aux androgènes.**

Dans le cas des syndromes d'insensibilité aux androgènes, on distingue les insensibilités partielles (*PAIS*) et les insensibilités complètes (*CAIS*). Ces pathologies se caractérisent par une résistance aux androgènes au niveau des organes cibles et se distinguent donc des pseudohermaphrodismes causés par des déficits en 3- $\beta$ HSD, 17- $\beta$ HSD, des hypoplasies des cellules de Leydig dues à une inactivation du récepteur de la LH ou encore des déficiences de la 5 $\alpha$ -réductase (Wilson et al., 1974). La résistance aux androgènes rencontrée dans ces pathologies est en relation avec un défaut de la structure même de AR qui le rend

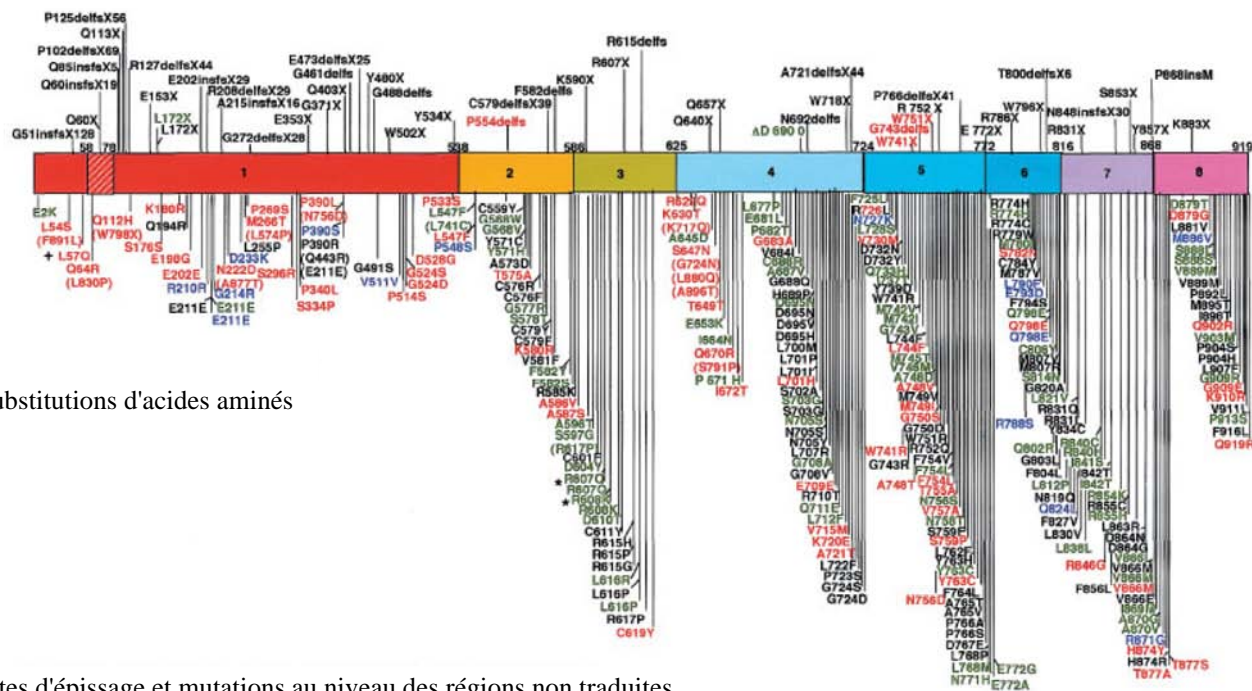


partiellement ou complètement inactif. L'insensibilité aux androgènes est une affection récessive liée au chromosome X. Les individus atteints ont un caryotype 46 XY et présentent une ambiguïté sexuelle plus ou moins développée. Une classification a été établie par Quigley (Quigley et al., 1995).

En effet, dans le cas des CAIS, les taux d'androgènes circulants sont normaux voire élevés mais les patients présentent un phénotype féminin : l'appareil génital externe est de type féminin, les structures dérivées des canaux de Wolff tels que l'épididyme ou les vésicules séminales sont absentes, la prostate est absente, on note une gynécomastie et une absence de pilosité pubienne et axillaire. En revanche, la sécrétion d'AMH par les testicules intra-abdominaux a prévenu la formation de l'utérus et des trompes de Fallope. Les patients sont donc stériles et présentent une aménorrhée primaire. Dans le cas PAIS, les phénotypes observés sont plus hétérogènes. On distingue des patients avec un appareil génital externe de type féminin, certains présentant une ambiguïté génitale associée ou non à une gynécomastie (syndrome de Reifenstein) mais aussi des individus stériles avec un phénotype masculin (Avila et al., 2001).

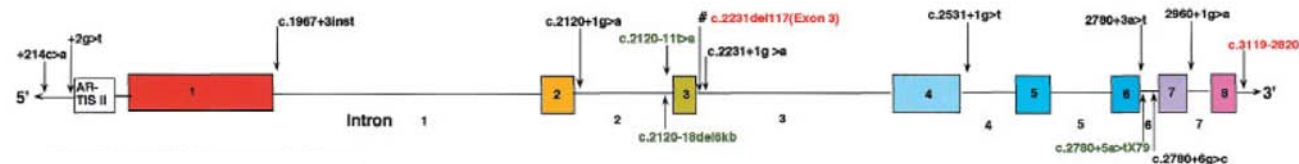
Ces pathologies résultent de mutations ponctuelles et plus rarement de délétions dans le gène codant AR. Ces dernières sont à l'origine d'une non-expression de AR ou d'un AR tronqué qui ne possède plus aucune fonctionnalité et se traduisent par une insensibilité complète aux androgènes. Néanmoins quelques cas de mutations ponctuelles dans l'exon 1 induisant un arrêt prématuré de la synthèse de AR ont aussi été identifiés. Les mutations peuvent aussi affecter l'affinité du récepteur pour son ligand si elles se situent dans la région codant pour le domaine de liaison du ligand. Ces mutations sont les plus fréquentes et peuvent être à l'origine de CAIS ou de PAIS. En effet, certaines mutations entraînent une synthèse d'un AR dépourvu de son LBD ou encore d'un récepteur présentant une absence de fixation ou une affinité moindre pour son ligand. Ces différences vont établir la sévérité de l'insensibilité aux androgènes. En 1994 une mutation affectant le LBD de AR a été identifiée chez un patient présentant un phénotype mâle avec néanmoins un volume testiculaire faible et une oligospermie (Yong et al., 1994). Ces symptômes ont pu être corrigés par administration de l'analogue mestérolone. De façon intéressante, une étude ultérieure a montré que cette mutation touchant le LBD n'affectait pas l'affinité de AR pour son ligand mais plutôt son interaction avec le co-activateur TIF2. Dans un test de double-hybride, cette interaction a été retrouvée en présence de mestérolone mais non de DHT (Yong et al., 1994). Il faut également noter l'existence de mutations affectant le domaine de liaison à l'ADN de AR. Ces dernières, bien qu'elles soient moins nombreuses, touchent principalement le premier doigt de zinc du

Délétions ou insertions de 1-6 bp et mutations induisant un arrêt prématuré de la traduction



Substitutions d'acides aminés

Sites d'épissage et mutations au niveau des régions non traduites



Mutations au niveau des introns

Noir: mutations germinales induisant un CAIS

Vert: mutations germinales induisant un PAIS

Bleu: mutations induisant un MAIS

Rouge: mutation somatique retrouvées dans les cancers de la prostate

\*: mutations retrouvées dans les cancers du sein chez l'homme

#: mutations retrouvées dans le cancer du sein chez la femme.

**Figure n°29: Position des différentes mutations retrouvées sur le gène du récepteur des androgènes.**

CAIS: syndrome d'insensibilité complète aux androgènes; PAIS: syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes; MAIS: syndrome d'insensibilité modérée aux androgènes; bp: paire de base. D'après Gottlieb et al., 2004.



DBD et sont responsables d'une absence d'activité transcriptionnelle du récepteur. Enfin, seules quelques mutations du domaine de transactivation N-terminal de AR ont été répertoriées et associées aux AIS. Une carte des différentes mutations associées aux AIS est disponible sur le site de l'université Mc Gill (*figure n°29*) <http://ww2.mcgill.ca/androgendb/>.

## 2. Le syndrome de Kennedy.

Le syndrome de Kennedy ou atrophie musculaire spino-bulbaire liée au chromosome X (*SBMA*) est une maladie récessive caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent associée à une insensibilité partielle aux androgènes (Kennedy et al., 1968). Les patients présentent une atrophie et une faiblesse musculaire qui se met en place progressivement et des syndrômes neurologiques entre 30 et 50 ans. De plus, on note une atrophie des testicules, une gynécomastie et une diminution de la fertilité. Les taux de testostérone sont néanmoins normaux voire plus élevés que chez un patient non affecté (Greenland and Zajac, 2004).

La cause de cette pathologie est l'expansion, dans l'exon 1 de AR, du nombre de triplets nucléotidiques de type CAG (glutamine). Cette succession de polyglutamines varie de 10 à 36 chez les individus sains alors qu'elle est supérieure à 40 et peut atteindre 60 répétitions chez les sujets présentant un syndrome de Kennedy (La Spada et al., 1991). Ces modifications se traduisent par une diminution de la capacité de liaison de AR à son ligand ainsi que de son activité transcriptionnelle (MacLean et al., 1995; Mhatre et al., 1993). Des rapports font en effet état d'un défaut de l'activité co-activatrice de membres de la famille p160 ou de l'interaction du co-activateur ARA24 avec un AR portant une amplification du nombre de polyglutamines (Hsiao et al., 1999; Irvine et al., 2000). Au contraire, une diminution du nombre de répétitions entraîne un gain de l'activité transcriptionnelle de AR (Chamberlain et al., 1994). De telles expansions de triplets sont aussi à l'origine d'autres maladies neurodégénératives telles que la Chorée de Huntington ou l'ataxie spino-cérébelleuse.

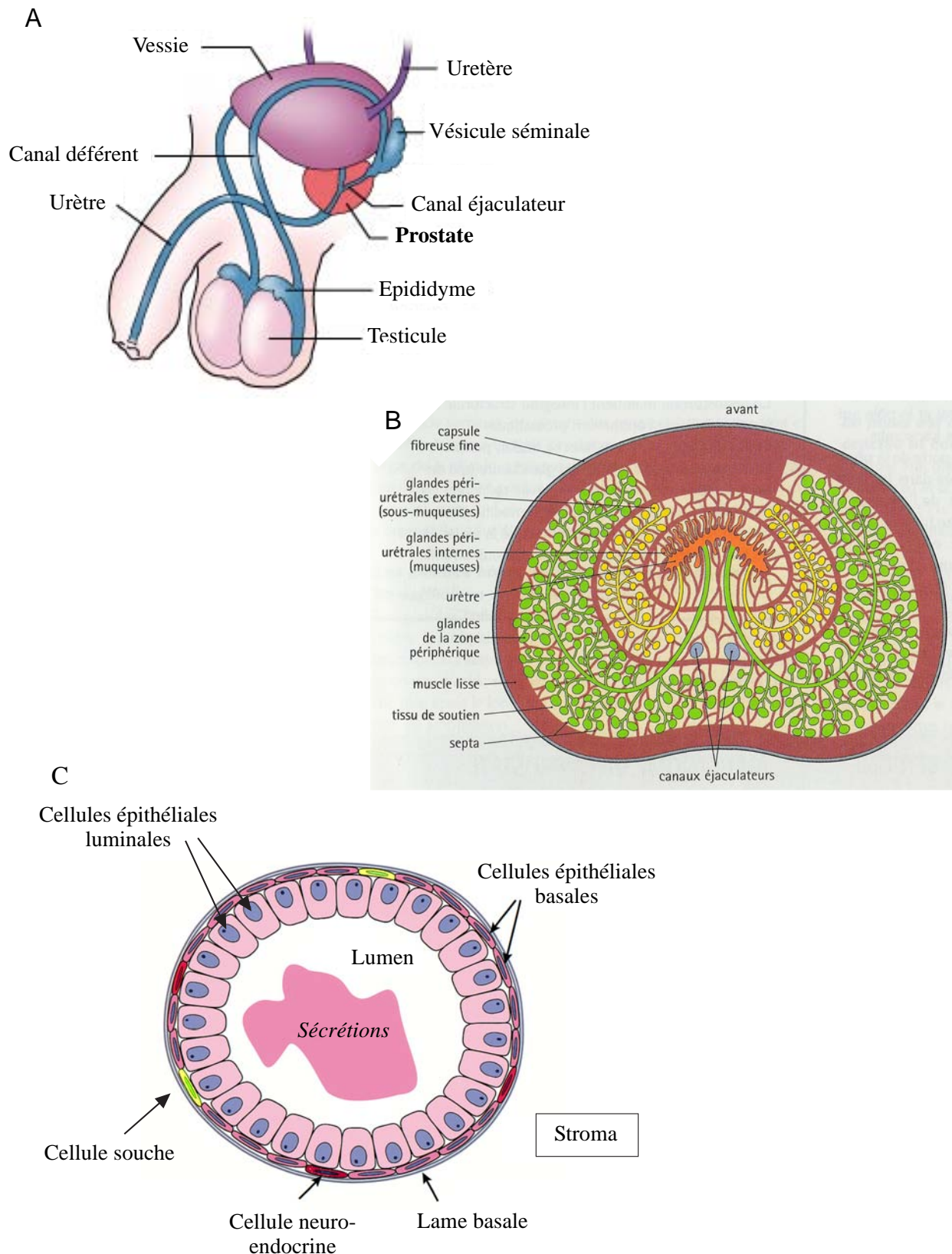
L'agrégation du récepteur des androgènes muté a été suggérée comme jouant un rôle crucial dans la pathologie de Kennedy. En effet, le récepteur muté peut être retrouvé sous forme d'inclusions intranucléaires neuronales (*NI*) ou cytoplasmiques chez les patients atteints du SBMA ainsi que chez des souris reproduisant cette pathologie (McEwan, 2001; Merry, 2005). Ces agrégations du récepteur sont supposées être en relation avec un défaut de son repliement. De plus, d'autres protéines qui régulent l'activité de AR sont aussi associées à ces inclusions :



on note les HSP70 et HSP40, l'ubiquitine mais aussi des co-activateurs tels que SRC-1 ou CBP (McCampbell et al., 2000; Stenoien et al., 1999). La présence des HSPs pourrait s'expliquer par un rôle préventif sur la formation des agrégats ainsi que sur leur capacité à induire leur dégradation (Bailey et al., 2002; Kobayashi et al., 2000) bien qu'un rapport récent présente des résultats différents pour HSP90 (Thomas et al., 2006). Les co-activateurs pourraient eux, être séquestrés au niveau des inclusions. De plus, la présence du récepteur muté se traduit souvent par une cytotoxicité et une mort cellulaire neuronale dans des modèles cellulaires (Avila et al., 2003; Ishihara et al., 2003) ou animaux (Merry, 2005). Cette toxicité pourrait être liée à une induction de l'apoptose induite par le clivage du récepteur par la caspase 3 (Ellerby et al., 1999). Néanmoins, la diversité des résultats obtenus *in-vitro* ou à l'aide de modèles animaux ne permet pas de faire un lien direct entre les agrégats et une éventuelle toxicité. La divergence des résultats obtenus peuvent être attribuées aux différentes lignées cellulaires ou aux transgènes utilisés qui ne portent pas le même nombre de répétitions ou qui n'expriment pas le récepteur mutant dans les mêmes proportions. L'hypothèse d'une cytotoxicité neuronale induite par un gain et non une perte de fonction de AR est aussi largement argumentée (Poletti, 2004). Enfin, il faut noter l'implication même des androgènes dans le développement de cette pathologie. En effet, la castration de souris transgéniques mâles reproduisant un SBMA avant l'apparition des symptômes élimine complètement le développement de la maladie. En revanche, l'administration de testostérone à des souris femelles induit le développement de la pathologie beaucoup plus rapidement (Katsuno et al., 2002). Une autre étude a mis en évidence la récupération d'une partie des fonctions neuronales par castration bien que la dégénérescence cellulaire ait déjà été mise en place (Chevalier-Larsen et al., 2004). Ce phénomène s'accompagne d'une diminution du niveau de la protéine mutante ainsi que de la formation des agrégats. Même si la recherche sur le syndrome de Kennedy a permis de faire des progrès notables dans la compréhension des mécanismes impliqués, à ce jour il n'existe pas encore de traitement pour cette affection.

### 3. Le cancer de la prostate.

Dans le chapitre I de cette étude, nous avons vu que les androgènes étaient nécessaires au développement, à la différenciation morphologique et fonctionnelle et au maintien des structures et fonctions de l'appareil génital mâle. Ces effets des androgènes s'appliquent en particulier à la prostate. Néanmoins, les androgènes sont aussi impliqués dans les



**Figure n°30: Localisation et structures anatomiques de la prostate humaine.**

**A.** Localisation de la prostate au sein de l'appareil génital masculin.

**B.** Coupe transversale d'une prostate humaine. D'après STEVENS and LOWE.

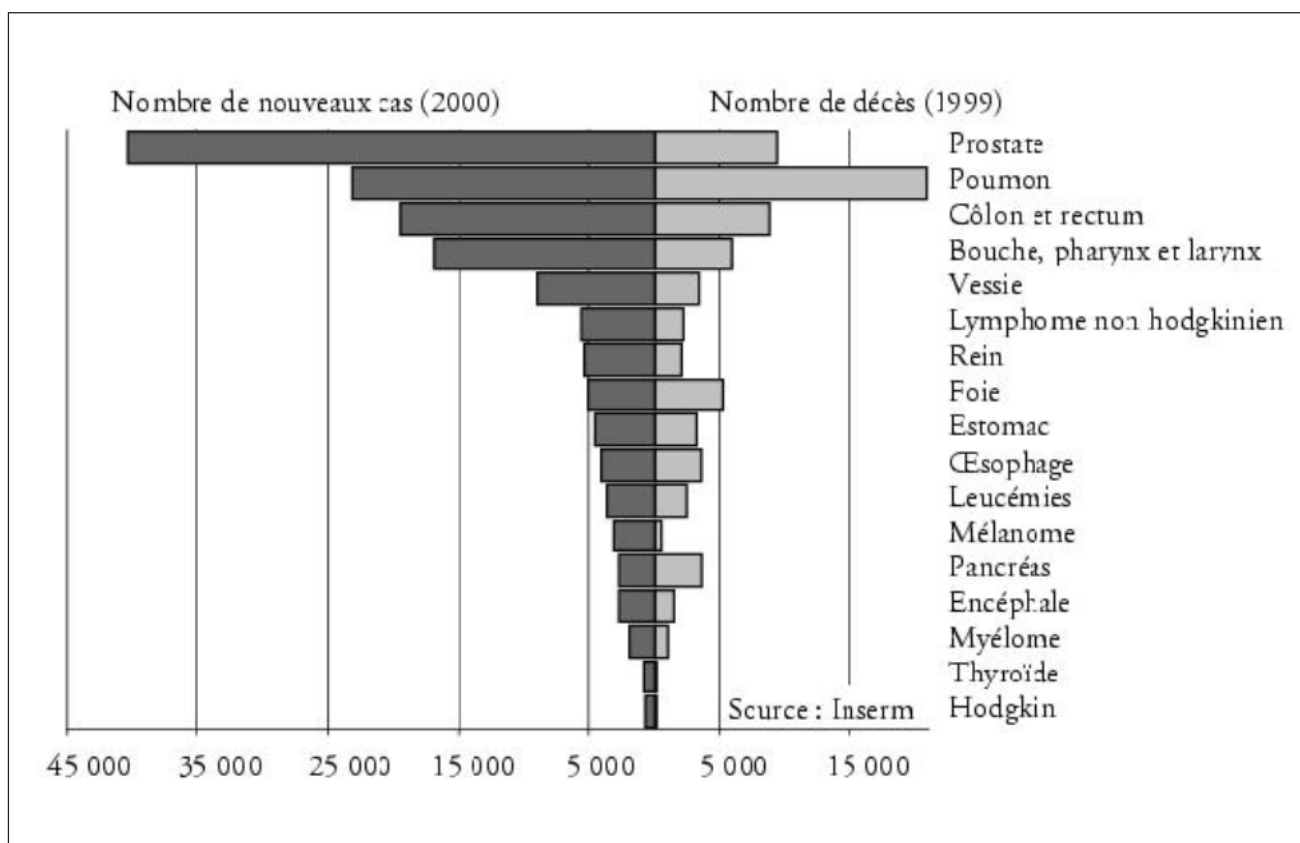
**C.** Différents types cellulaires qui composent les canaux prostatiques. Modifié d'après Abath-Shen et Shen, 2000.

dysfonctionnements de cette glande et en particulier dans la croissance anarchique des cellules cancéreuses prostatiques. Après avoir décrit brièvement la structure et la fonction de la glande prostatique, nous ferons un point sur les différents stades d'évolution de la pathologie et enfin nous tâcherons de mieux cerner les processus moléculaires associés à la mise en place et au développement du cancer.

#### a. La glande prostatique.

La prostate est une glande exocrine située au carrefour de la voie urinaire et génitale. En effet, c'est à son niveau que les canaux éjaculateurs provenant des vésicules séminales rejoignent l'urètre. On la retrouve sous la vessie, enveloppée dans une capsule fibreuse qui dessine des lobules mal définis. La prostate est constituée de différents tissus glandulaires organisés de façon concentrique en glandes péri-urétrales internes, externes et glandes de la zone périphérique ainsi que de canaux qui rejoignent l'urètre (*figure n°30*).

Les unités glandulaires de la prostate sont majoritairement composées de cellules épithéliales qui reposent sur une lame basale et sont maintenues par un stroma fibromusculaire. On distingue les cellules épithéliales luminales sécrétrices qui sont hautes et qui débouchent dans la lumière des canaux. Ces cellules sont responsables de la production du liquide prostatique, expriment AR et sont androgéno-dépendantes pour leur fonction et survie. Ces cellules reposent sur une couche régulière et continue de cellules épithéliales basales qui sécrètent entre autres les composants de la membrane basale. Entre ces cellules, il existe plus rarement des cellules neuro-endocrines qui participeraient à la croissance et à la différenciation (di Sant'Agnese, 1992) ainsi que des cellules supposées souches pour le remplacement des cellules luminales sécrétrices. Ces quatre types cellulaires reposent sur une lame basale entourée par un stroma fibromusculaire au niveau duquel on retrouve des cellules endothéliales mais aussi des fibroblastes, des cellules musculaires, des macrophages ou encore des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le stroma prostatique joue un rôle de cohésion entre les unités glandulaires et sécrète des facteurs de croissance qui modulent la prolifération et l'activité sécrétoire de l'épithélium. On note parmi ces facteurs de croissance l'EGF (*epidermal growth factor*), le FGF (*fibroblast growth factor*) ou encore le TGF (*transforming growth factor*). Ce sont des régulateurs importants du développement et de la réponse hormonale de la prostate (Chung, 1995) et la dérégulation des équilibres qui existent est largement incriminée dans la tumorigenèse prostatique (Russell et al., 1998).



**Figure n°31: Diagramme représentant la fréquence des cancers et le nombre de décès associés à ces cancers chez les hommes en France.**

D'après Hill et Doyon, 2004.

La principale fonction de la prostate est la production du liquide séminal en association avec les vésicules séminales. Ces sécrétions représentent environ 95% du volume d'un éjaculat. Les sécrétions prostatiques joueraient un rôle de protection des spermatozoïdes en favorisant leur survie et leur pouvoir fécondant dans les voies génitales (Kelly et al., 1991) ou en les protégeant contre des agents pathogènes (Krieger and Rein, 1982; Sitaram and Nagaraj, 1995). Ce liquide contient notamment des protéines et glycoprotéines telle que l'albumine, du cholestérol et des phospholipides, des phosphatases acides, des prostaglandines, des amylases, une polyamine qui est la spermine et des kallikréines dont le PSA. Le PSA est en partie responsable de la liquéfaction du sperme grâce à une protéolyse des protéines séménogeline I et II et de la fibronectine.

b. Epidémiologie et facteurs de risque du cancer de la prostate.

En l'an 2000, le cancer de la prostate a été diagnostiqué en France chez plus de 40.000 hommes et a été la cause de plus de 9000 décès (Hill and Doyon, 2005). Il représente ainsi le cancer le plus diagnostiqué chez l'homme et la deuxième cause de mortalité par cancer après celui du poumon (*figure n°31*). Depuis 1950, l'incidence du cancer de la prostate n'a cessé d'augmenter. En effet, le nombre de cas diagnostiqués a été multiplié par 4 depuis 1980 (Villers and Soulie, 2004). Ceci s'explique entre autre par un dépistage plus systématique, des outils d'analyse plus efficaces tel que le dosage du PSA et une baisse de la mortalité causée par les autres pathologies telles que les maladies cardiovasculaires. Ainsi, les risques cumulés de diagnostic et de décès au cours de la vie en 2000 étaient respectivement de 14,9% et de 5% ; un homme sur 7 était diagnostiqué pour un cancer de la prostate et un homme sur 20 en mourrait (Hill and Doyon, 2004). Néanmoins, depuis 1990 on note une diminution du taux de mortalité du cancer de la prostate en France mais aussi dans d'autres pays tels que le Canada ou les Etats-Unis. Cette observation pourrait s'expliquer par un diagnostic plus précoce et des traitements plus efficaces. Plusieurs facteurs de risque semblent associés au cancer de la prostate.

➤ Un des déterminants majeurs du cancer de la prostate est le facteur âge : il existe une forte corrélation entre l'incidence et l'âge des sujets qui le développent. En effet, ce cancer n'est que très rarement diagnostiqué chez des sujets de moins de 50 ans. L'âge moyen de cette pathologie est de 72-74 ans avec 85% des diagnostics qui sont faits chez des sujets de plus de





65 ans (Gronberg, 2003). Des résultats d'autopsie suggèrent que la plupart des hommes de plus de 85 ans ont un cancer de la prostate. La diminution progressive du taux d'androgènes au cours du vieillissement pourrait ainsi être impliquée (Algarte-Genin et al., 2004).

➤ L'appartenance ethnique est aussi un facteur important quant aux risques de développer un cancer de la prostate puisque l'incidence peut varier d'un facteur 90 entre certaines populations de Chine et les individus d'origine africaine vivant en Amérique du Nord. Des études réalisées sur des chinois émigrés aux Etats-Unis révèlent que leur incidence de cancer de la prostate augmente. Ceci laisse suggérer que les coutumes de vies sont impliquées dans le développement du cancer de la prostate. Néanmoins, cette croissance n'est que de 50% par rapport à celle de la population blanche et de 25% par rapport à celle de la population noire. Ceci confirme ainsi l'existence d'une différence de risque de développer un cancer selon l'appartenance ethnique (Muir et al., 1991).

➤ Le fait de retrouver plusieurs personnes atteintes d'un cancer de la prostate dans une même famille peut être lié à la susceptibilité génétique, à l'exposition à des facteurs communs environnementaux ou encore au hasard puisque la prévalence de cette maladie est très élevée. Néanmoins, les formes familiales du cancer de la prostate (plus de 2 cas dans la famille) représentent environ 25% des cas (Cussenot and Valeri, 2001). Une étude réalisée sur des jumeaux mono et di-zygotes a estimé le caractère héréditaire du cancer de la prostate à 42% (Lichtenstein et al., 2000). Ce chiffre élevé n'a néanmoins jamais été retrouvé dans d'autres études. Plusieurs locis ont été identifiés pour l'ensemble des formes héréditaires du cancer de la prostate sur les chromosomes 1, 20, 17, 15 et X (Lange et al., 2006; Schaid, 2004). Une autre composante génétique du cancer de la prostate réside dans le polymorphisme de certains gènes. En effet, une étude de Irvine et coll. a mis en évidence une relation inverse entre le nombre de répétitions CAG (glutamine) et GGC (glycine) du domaine amino-terminal du récepteur des androgènes et le risque de développer un cancer de la prostate (Irvine et al., 1995). De telles associations ont aussi été faites avec le gène du récepteur de la vitamine D (Ingles et al., 1998), de le cytochrome P450c17 (Lunn et al., 1999) ou encore de la 5 $\alpha$ -réductase (Nam et al., 2001). Néanmoins, la plupart de ces études ont été réalisées sur un faible nombre de patients et n'ont pas toujours été confirmées.

➤ L'association entre le cancer de la prostate et la composante alimentaire a fait l'objet de nombreuses études. Si certaines d'entre elles sont conflictuelles ou négatives, d'autres

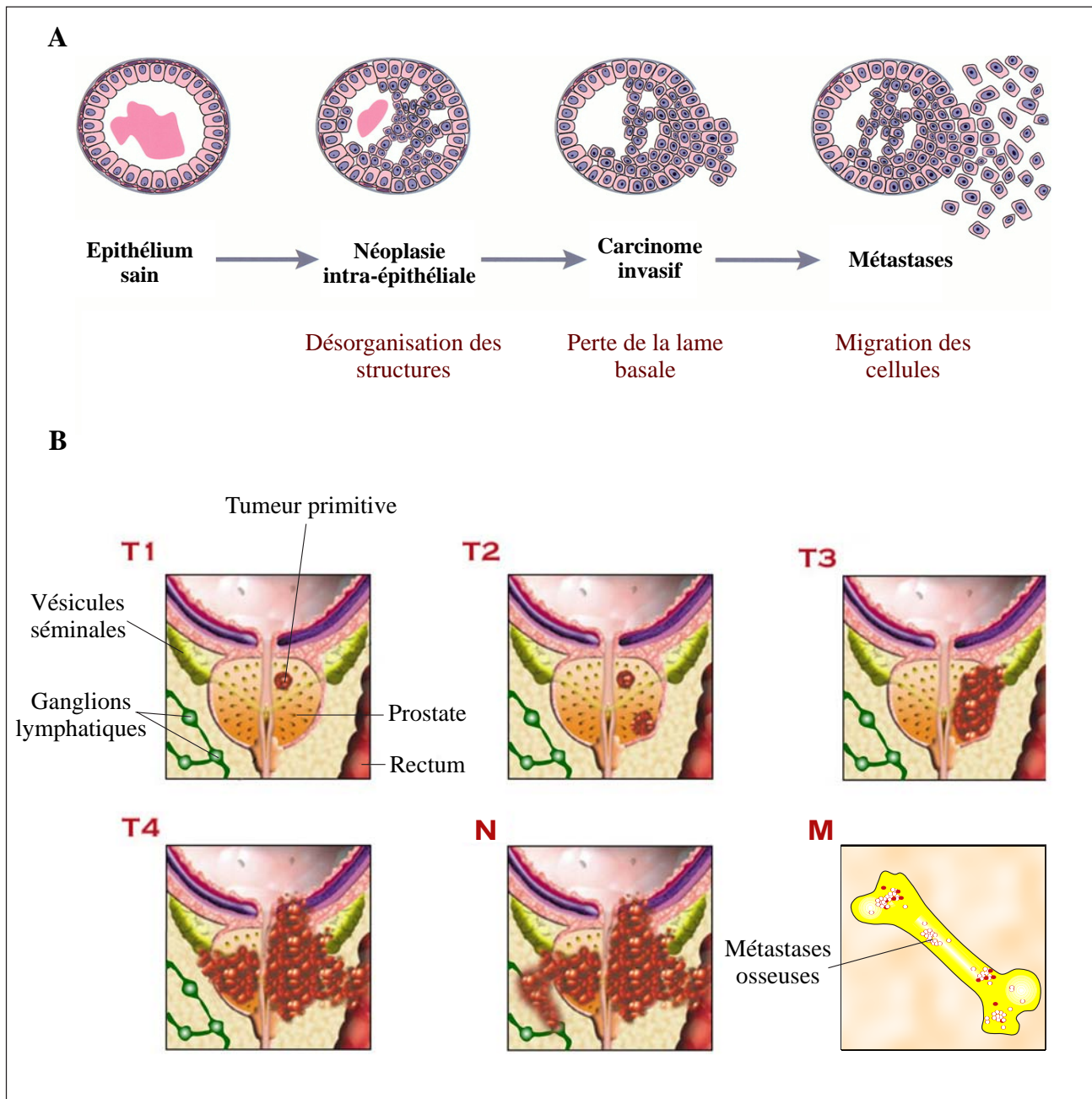


semblent plus convaincantes. Ainsi, un régime riche en graisses saturées animales que l'on retrouve dans la viande rouge serait favorable au développement du cancer de la prostate par rapport à un régime riche en graisses insaturées correspondant aux huiles végétales et graisses de poisson (Bravo et al., 1991; Giovannucci et al., 1993; Hayes et al., 1999; Lee et al., 1998a; Veierod et al., 1997). Il faut noter qu'une hypothèse avancée pour ces observations est une différence du mode de cuisson. A hautes températures, la viande rouge produit en effet des produits carcinogènes. La consommation importante de phyto-œstrogènes alimentaires en Asie, tels que les flavonoïdes pourrait expliquer la faible incidence du cancer de la prostate chez ses occupants. De même, la sauce tomate qui contient un antioxydant, le lycopène, est associée à un risque réduit du cancer de la prostate (Giovannucci et al., 2002). Une forte consommation de sauce tomate chez des patients atteint d'un cancer de la prostate, se traduit par une diminution du taux de PSA et une diminution des dommages oxydatifs au niveau de la prostate avant une prostatectomie (Chen et al., 2001). Le sélénium et la vitamine E ont tous les deux été rapportés comme de puissants effecteurs bénéfiques sur l'incidence et la mortalité du cancer de la prostate (Clark et al., 1996; Clark et al., 1998; Heinonen et al., 1998). Ainsi, les aliments et nutriments semblent être largement impliqués dans la mise en place ou la prévention du cancer de la prostate, mais le lien entre les deux est souvent difficile à mettre en évidence.

➤ Les études tentant de relier le cancer de la prostate à la consommation d'alcool, de cigarettes ou à la pratique d'exercices physiques se sont révélées négatives.

#### c. Stades d'évolution de la maladie.

Il faut tout d'abord différencier l'hyperplasie bénigne de la prostate et l'adénocarcinome prostatique. L'hyperplasie bénigne de la prostate (*BPH*) aussi appelée hypertrophie ou adénome prostatique correspond à une augmentation du volume de la prostate non tumorale qui touche 70% des hommes de 60 ans (Isaacs, 1994). Elle résulte d'une prolifération cellulaire bénigne dans le tissu prostatique. Cette croissance touche essentiellement le noyau glandulaire situé immédiatement au contact de la paroi de l'urètre. On note une hyperplasie des cellules épithéliales basales, une augmentation de la masse stromale, de la matrice extra-cellulaire et une perte du tissu élastique. Ceci entraîne entre autre la compression de l'urètre et des problèmes de miction. Plusieurs facteurs semblent responsables de cette affection tels que



**Figure n°32: Stades d'évolution du cancer de la prostate.**

**A.** Désorganisation des canaux prostatiques conduisant à un cancer de la prostate invasif et métastatique. Modifié d'après Abath-Shen et Shen, 2000.

**B.** Différents stades d'évolution d'un adénocarcinome selon la classification TNM. Stade **T1**: Tumeur localisée de la prostate. Stade **T2**: Tumeur disséminée en plusieurs foci tumoraux. Stade **T3**: Tumeur envahissant les vésicules séminales. Stade **T4**: Tumeur invasive au niveau des organes périphériques: vessie, rectum. Stade **N**: Adénopathie régionale avec atteinte des ganglions lymphatiques. Stade **M**: formation de métastases à distance, majoritairement au niveau des os.

des variations des taux d'hormones stéroïdes intra-prostatiques, des voies de communication nerveuses ou des réponses inflammatoires (Untergasser et al., 2005).

La formation d'un adénocarcinome et son évolution se déroulent en plusieurs étapes (**figure n°32**). De nombreux arguments suggèrent que les néoplasies intra-épithéliales prostatiques (PINs) sont des précurseurs des adénocarcinomes. La mise en place des PINs se traduit par une désorganisation des structures des unités prostatiques. En fonction de leur architecture et de leur aspect cytologique, elles sont classées en PINs de bas (*LG : Low Grade*) et haut grade (*HG : High Grade*) (Joniau et al., 2005). Les PINs de haut grade seraient une transition entre les PINs de bas grade et les carcinomes invasifs (Abate-Shen and Shen, 2000; Bostwick and Qian, 2004). En effet, les PINs se retrouvent surtout dans les zones périphériques de la prostate à proximité des formes invasives des adénocarcinomes. De plus, l'apparition des PINs de haut grade précède très fréquemment la formation d'un carcinome dans les dix années qui suivent, ce qui est cohérent avec l'idée d'une progression de la pathologie. Ces affections sont retrouvées beaucoup plus fréquemment et de façon plus prononcée dans une prostate tumorale que dans une prostate saine. Les HGPINs peuvent présenter une atteinte de la couche des cellules épithéliales basales à l'identique de ce qui est observé pour les carcinomes invasifs. Ces deux types de lésions présentent les mêmes altérations de marqueurs de différenciation. Enfin, elles partagent aussi des anomalies chromosomiques identiques. Néanmoins, à l'inverse des adénocarcinomes, les PINs n'affectent pas la lame basale et ne sont pas à l'origine d'une élévation du taux de PSA sanguin. La perte de la lame basale est en effet une caractéristique des carcinomes invasifs. Ces derniers présentent une très forte prolifération des cellules épithéliales basales et luminales ce qui se traduit par un taux élevé de PSA dans le sang. Les cellules cancéreuses peuvent ensuite évoluer vers un stade encore plus agressif capable d'envahir les tissus périphériques, notamment les vésicules séminales mais aussi la vessie ou le rectum (Wittekind et al., 2002). Le stade ultime des tumeurs prostatiques se traduit par la formation de métastases. Elles sont associées à une perte d'adhérence des cellules entre elles et à la matrice extra-cellulaire, un passage dans le système lymphatique ou sanguin et une recolonisation de tissus périphériques tels que les ganglions lymphatiques, les os ou encore le cerveau (Salvati et al., 2005; Tantivejkul et al., 2004; Zeng et al., 2005).

Lorsqu'une tumeur de la prostate est localisée et qu'elle n'a pas envahi les ganglions et les tissus périphériques, la prostatectomie radicale reste le traitement curatif le plus efficace. Cette opération consiste à enlever non seulement la prostate mais aussi les vésicules séminales après avoir vérifié l'absence d'extension du cancer. Les praticiens essaient de



préserver les nerfs érecteurs qui passent au contact de la prostate afin de diminuer le risque d'impuissance post-opératoire. Un autre soin utilisé dans le cas de cancers localisés ou peu invasifs est la radiothérapie. On distingue la radiothérapie externe pour laquelle le rayonnement produit par une source externe est focalisé sur la zone tumorale et la curiethérapie qui consiste en l'introduction de sources radioactives au cœur même de la zone tumorale. Cette dernière technique présente beaucoup moins d'effets secondaires que la radiothérapie externe responsable de lésions du système digestif et urinaire. De plus, la curiethérapie autorise une plus grande précision dans le ciblage de la zone à irradier.

L'hormono-sensibilité du cancer de la prostate est connue depuis de nombreuses années (Huggins and Hodges, 1972). Le traitement hormonal est utilisé chez les patients dont le cancer s'étend au-delà des limites de la prostate y compris au stade métastatique, ou a récidivé après un traitement initial. Il peut cependant être également utilisé dans certains cas, en cas de cancer localisé à la prostate, pour diminuer le volume de la prostate et obtenir une synergie avec un autre mode de traitement (avant chirurgie ou radiothérapie) ou à titre palliatif chez des patients très âgés. Ce traitement consiste à inhiber la synthèse et l'action des androgènes. Ce traitement peut consister en une castration physique qui se traduit par une orchidectomie bilatérale (ablation des testicules) ou de la pulpe testiculaire (pulpectomie). Cette opération est surtout pratiquée dans le cas de métastases au niveau des testicules ou encore dans les situations d'urgence nécessitant une baisse rapide du taux d'androgènes. Le traitement avec des anti-androgènes est couramment utilisé. Il peut s'agir d'anti-androgènes stéroïdiens tels que l'acétate de cyprotérone qui entre en compétition avec la DHT au niveau périphérique et qui joue aussi un rôle au niveau central en bloquant la sécrétion de la LH hypophysaire. Les anti-androgènes non-stéroïdiens (flutamide, bicalutamide, nilutamide) agissent eux, au niveau périphérique en bloquant l'action des androgènes, y compris ceux d'origine surrénalienne. L'action des anti-androgènes est de plus associée à un traitement par des analogues de la LHRH, qui par une stimulation continue des cellules gonadotropes, induisent un arrêt de sécrétion de la LH. De nouvelles molécules antagonistes de la LHRH sont également efficaces grâce à un blocage direct des récepteurs au niveau de l'hypophyse. Enfin, l'administration d'œstrogènes a été un traitement fréquemment employé pendant de nombreuses années. Ils ont en effet la capacité de supprimer la sécrétion de la LH, d'inhiber la 5 $\alpha$ -réductase et possèdent une action toxique à forte dose au niveau cellulaire (Carruba et al., 1996). Cependant, ils présentent des effets secondaires notamment au niveau des risques cardiovasculaires (Cox and Crawford, 1995). Néanmoins, si le taux initial de réponse à l'hormonothérapie est d'environ 80% avec une disparition rapide des douleurs et une





diminution du PSA, ce traitement n'est efficace que durant 18 à 24 mois (Goktas and Crawford, 1999; Harris and Reese, 2001). Les patients développent ensuite une hormono-résistance au cours de laquelle les cellules cancéreuses prolifèrent même en l'absence d'androgènes. Des traitements de seconde ligne ne produisent une réponse que dans 25% des cas mais leur efficacité n'est que de quelques mois (Goodin et al., 2002). La chimiothérapie est utilisée dans le cancer de la prostate quand celui-ci a évolué avec une extension extraprostatique et qu'il ne répond plus au traitement hormonal. La chimiothérapie diminue la croissance tumorale et peut diminuer les douleurs liées au cancer mais ne prolonge pas la durée de vie.

A ce stade, les cellules tumorales utilisent des voies alternatives qui autorisent leur survie et leur croissance. Ces mécanismes feront l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

## **B. Aspects moléculaires associés à l'hormono-résistance du cancer de la prostate.**

Il est clairement établi que le développement du cancer de la prostate et sa progression vers une phase d'échappement hormonal sont le résultat d'évènements multiples. Il semble néanmoins que le récepteur des androgènes joue un rôle central primordial. En effet, dans les phases précoces du développement tumoral, nous avons vu précédemment que la majorité des cancers répondent à un traitement anti-androgénique par une involution de la tumeur. Il apparaît néanmoins certains désordres moléculaires qui induisent une prolifération cellulaire et une activation de AR en absence ou en présence de très faibles quantités de son ligand.

### **1. Activation de AR dépendante du ligand.**

#### **a. Amplification du gène AR.**

L'amplification du gène AR situé sur la région chromosomique Xq11-q13 a été proposée comme un des mécanismes autorisant la croissance des cellules tumorales en réponse à de très faibles quantités d'androgènes circulants après hormono-thérapie. Plusieurs études rapportent que l'amplification de AR ne se produit que très rarement dans des cancers primaires non-



traités avec une fréquence de seulement 0-5% alors que l'on retrouve une telle amplification dans 25 à 30% des cancers hormono-résistants (Edwards et al., 2003; Koivisto et al., 1997; Merry, 2005; Visakorpi et al., 1995). Ces événements peuvent se mettre en place durant un traitement par des anti-androgènes tels que le bicalutamide (Palmberg et al., 1997). Une étude plus récente basée sur des paires de biopsies de patients en hormono-thérapie puis en hormono-résistance permet de mettre en évidence une telle amplification dans 20% des tumeurs en échappement hormonal (Edwards et al., 2003). Cette étude a aussi permis de corréler une augmentation de l'accumulation de AR pour 80% des tumeurs qui présentent une amplification lorsqu'elles échappent à l'hormono-thérapie. Il faut néanmoins noter que 35% des tumeurs ne présentant pas d'amplification du gène AR, le surexpriment à un niveau protéique. Ceci suggère que si une accumulation plus importante de AR est associée à une amplification du gène, elle peut aussi résulter de mécanismes alternatifs impliquant des régulations post-traductionnelles associées à des dérégulations de voies de signalisation. Toutefois, s'il semble que l'amplification du gène AR est associée dans un certain nombre de cas à la progression des tumeurs vers l'hormono-résistance, elle n'est pas systématiquement corrélée à un niveau protéique supérieur de AR. Ceci souligne l'existence de mécanismes alternatifs pour expliquer la sensibilité plus importante des cellules tumorales à de faibles niveaux d'hormones circulantes.

#### b. Les mutations activatrices de AR.

Plusieurs études rapportent une acquisition de mutations sur le gène codant pour AR plus importante dans des cellules hormono-résistantes métastatiques que dans les cellules de la tumeur primaire (Marcelli et al., 2000; Taplin et al., 1995) (*figure n°29*). Ainsi, les mutations de AR pourraient donner aux cellules un avantage de croissance en absence ou en présence de très faibles quantités d'hormone ou encore en présence de ligands atypiques.

Une mutation bien caractérisée est la mutation ponctuelle au niveau du codon 877 qui se situe dans le LBD de AR et qui consiste en une substitution d'une Thréonine en Alanine : T877A (Veldscholte et al., 1992). Cette mutation a été identifiée dans des cellules cancéreuses de prostate humaine LNCaP et confère au récepteur des androgènes une activation par les œstrogènes, par la progestérone, la DHEA mais aussi par des anti-androgènes (Tan et al., 1997). Récemment, une étude a clairement mis en évidence une croissance plus importante de cellules portant cette mutation en absence ou en présence de R1881 (Sun et al., 2006). De



plus, cette mutation confère aux cellules une résistance à l'inhibition de croissance et à l'apoptose induite par le suppresseur de tumeur p53 (Sun et al., 2006). On la retrouve dans des biopsies tumorales de prostate humaine en hormono-résistance mais également au niveau de métastases osseuses chez des patients traités par du flutamide (Suzuki et al., 1996; Taplin et al., 1999). La mutation Valine 515 Méthionine (*V515M*) également retrouvée au niveau de certaines tumeurs autorise la fixation de DHEA et d'androstènedione à AR (Tan et al., 1997). Une autre mutation correspondant à une substitution de Leucine 701 en Histidine (*L701H*) a aussi été identifiée chez des patients (Suzuki et al., 1993). Dans des cellules naïves, le récepteur muté L701H ne répond que très faiblement à la DHT mais possède par contre une forte affinité pour le cortisol et la cortisone (Zhao et al., 2000). De plus, ces deux ligands stimulent la transcription dépendante de AR et la croissance de cellules tumorales prostatiques qui portent cette mutation est augmentée.

Enfin, on peut aussi noter une mutation ponctuelle dans la région charnière Hinge correspondant à la substitution d'une glutamine en un codon stop (*Q640Stop*) retrouvée en combinaison avec la mutation T877A au niveau de métastases osseuses (Ceraline et al., 2004). Dans des cellules naïves CV1, ce mutant est exclusivement nucléaire en présence et en absence de DHT. De plus sa surexpression en présence du mutant T877A se traduit par une activité transactivatrice constitutive et très élevée.

On peut ainsi supposer que ces différentes mutations, seules ou en combinaison, permettent l'activation du récepteur des androgènes en absence ou en présence de très faibles niveaux de ligand ou encore d'un ligand atypique. Ceci induirait ainsi une croissance des cellules tumorales par sélection clonale suite à une pression de sélection favorisant de telles mutations.

### c. Les co-activateurs de AR et le cancer de la prostate.

Nous avons étudié dans le chapitre II la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes par son interaction avec des co-régulateurs et notamment des co-activateurs. Plusieurs études établissent des corrélations entre les niveaux d'accumulation de ces protéines et l'état tumoral de la prostate ou encore l'acquisition de l'androgéno-indépendance.

Les co-activateurs de la famille p160 ont largement été étudiés dans la pathologie prostatique. Il apparaît clairement une sur-expression de SRC1 dans des cancers hormono-résistants par rapport à des cancers hormono-dépendants ou des BPH (Gregory et al., 2001). Une autre étude plus récente fait une corrélation entre le niveau d'accumulation de SRC1 et le score de

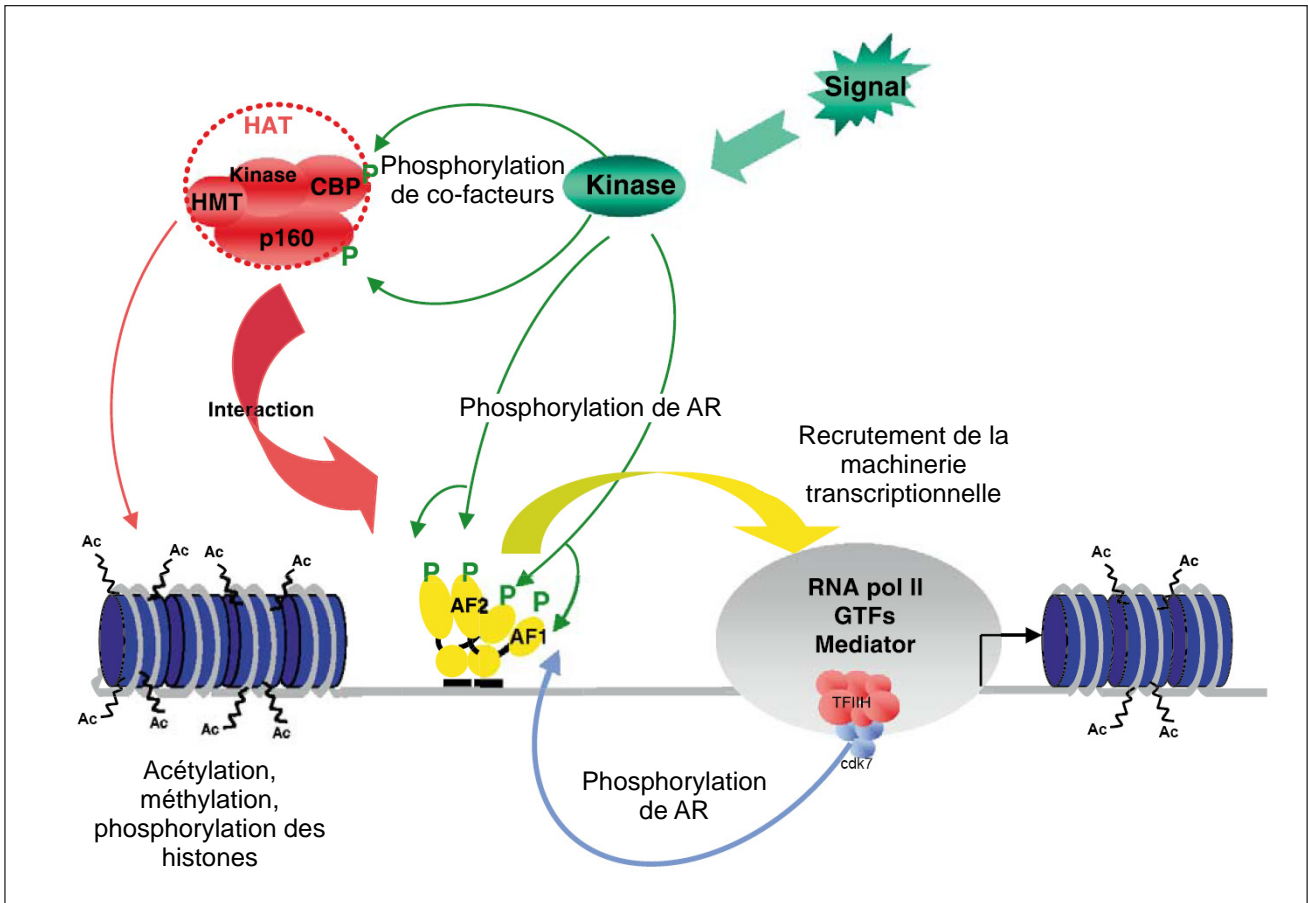


Gleason, l'extension extra-capsulaire de la prostate ou encore les métastases au niveau des ganglions lymphatiques de la région pelvienne (Agoulnik et al., 2005). De même, TIF2 est également surexprimé dans le noyau des cellules cancéreuses de patients en hormono-résistance par rapport à des échantillons de tumeurs hormono-sensibles ou de BPH (Gregory et al., 2001). De plus, dans le modèle de xénogreffes du cancer de la prostate humain CWR22, les auteurs montrent que la surexpression de SRC1 ou de TIF2 autorise la liaison de AR avec la DHEA et l'androstènedione, et que cette liaison se traduit par une activation transcriptionnelle de AR. Enfin, le co-activateur SRC3 semble aussi être plus fortement accumulé dans les cellules cancéreuses et son niveau d'accumulation est corrélé à une vitesse de prolifération supérieure et un index apoptotique inférieur des cellules cancéreuses analysées sur les biopsies (Zhou et al., 2005).

Il semble aussi exister un lien entre la localisation du co-activateur de AR Tip60 et la progression de tumeurs prostatiques vers l'hormono-résistance (Halkidou et al., 2003). La majorité des cancers hormono-résistants (87%) présentent en effet une accumulation nucléaire de Tip60 alors que la distribution est beaucoup plus diffuse au niveau des BPH ou des cancers non-traités. La privation androgénique de cellules LNCaP ou CWR22 se traduit par une redistribution nucléaire de Tip60 ainsi que d'une surexpression de ce dernier. Inversement, la supplémentation du milieu avec des androgènes résulte en un marquage plus diffus de Tip60, à l'image de celui observé dans les BPH. Ainsi, la relocalisation de Tip60 suite à la privation androgénique pourrait participer à l'acquisition de l'androgéno-indépendance. Le co-régulateur Tip60 pourrait stimuler l'activité transcriptionnelle de AR par une acétylation directe de ce dernier (Gaughan et al., 2002).

On peut aussi noter l'accumulation de l'arginine méthyltransférase CARM1 plus importante dans des cellules épithéliales d'adénocarcinomes que dans les PINs, elle-même plus importante que dans le tissu sain. Ces différences de marquage se vérifient aussi bien au niveau du cytoplasme que du noyau des cellules (Hong et al., 2004). De plus, les auteurs mettent également en évidence une accumulation supérieure de CARM1 dans des tumeurs hormono-résistantes par rapport à des tumeurs de patients non-traités.

Enfin, d'autres co-activateurs de AR sont connus pour modifier sa spécificité de liaison au ligand. Ainsi, ces co-activateurs peuvent changer l'action d'un antagoniste en un effet agoniste. Ceci a été rapporté pour CBP, la  $\beta$ -caténine, ARA55 ou ARA70 (Gelfanov et al., 2001; Kang et al., 1999). Alors que ARA55 et la  $\beta$ -caténine augmentent l'activité transcriptionnelle de AR en réponse à l'estradiol, CBP et ARA70 autorisent AR à répondre positivement à l'anti-androgène hydroxyflutamide. De plus AR peut aussi être activé par de



**Figure n°33: Activation du récepteur des androgènes suite à sa phosphorylation et à celle de ses co-facteurs par des voies de signalisation intra-cellulaires.**

Suite à un signal extra-cellulaire, différentes voies de signalisation impliquant des protéines kinases induisent une phosphorylation de AR et de ses co-facteurs. Il en résulte un recrutement de ces co-facteurs au niveau de la chromatine qui se traduit par une ouverture de cette dernière, un recrutement de AR et de la machinerie transcriptionnelle. Cette activation de la transcription dépendante du récepteur des androgènes pourrait se mettre en place indépendamment de la présence du ligand et ainsi être impliquée dans l'acquisition de l'hormono-indépendance du cancer de la prostate suite à des perturbations des voies de signalisation intra-cellulaires. HAT, histone acétyltransférase; HMT, histone méthyltransférase; GTFs: facteurs généraux de la transcription; cdk: cyclin dépendant kinase; Ac, acétyl; P, phosphate; TFIID, transcription factor IID. D'après Rochette-Egly, 2002.



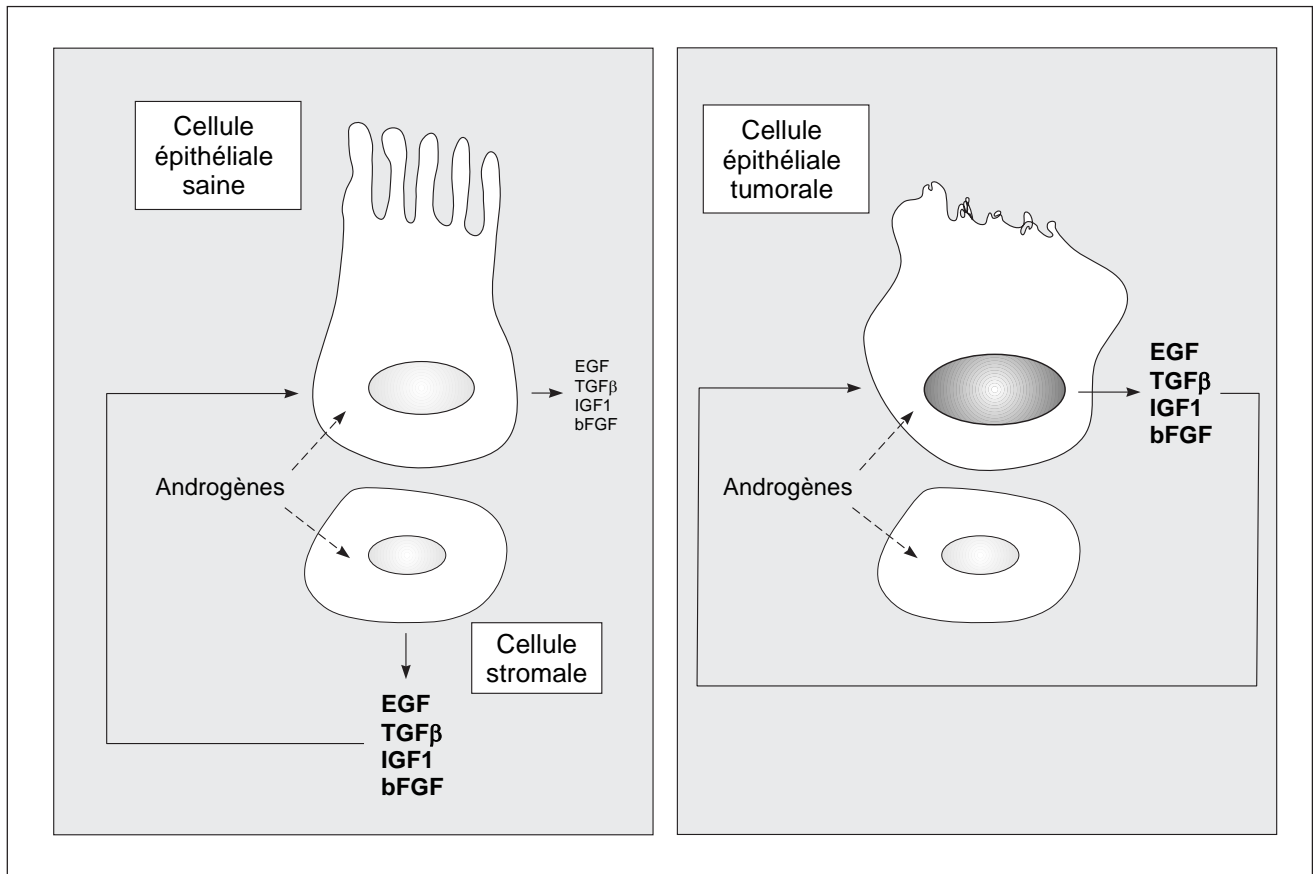
très faibles doses d'androgènes surrénaliens dans des cellules de cancer prostatique surexprimant ARA70 (Miyamoto et al., 1998).

Ces différentes études supportent l'hypothèse de l'implication des co-activateurs de AR dans la progression de la tumeur prostatique mais aussi de sa dérive vers une croissance androgéno-indépendante. La dérégulation de leur niveau d'expression pourrait en effet exacerber leur activité de co-activateur et ainsi promouvoir l'activité transcriptionnelle de AR en présence de très faibles niveaux de ligand ou de ligands autres que les androgènes. Il faut aussi noter que la surexpression d'un seul co-activateur de AR n'est pas un phénomène exclusif et que certaines tumeurs surexpriment simultanément plusieurs co-activateurs (Gregory et al., 2001).

## 2. Activation de AR indépendante de son ligand par différentes voies de signalisation intra-cellulaires.

La progression du cancer de la prostate est souvent associée à une altération du taux des facteurs de croissance ou de leurs récepteurs au niveau de la tumeur (Djakiew, 2000; Russell et al., 1998). La liaison des facteurs de croissance et des cytokines à leur récepteur membranaire initie une cascade de phosphorylations impliquant de nombreuses protéines intra-cellulaires dont les cibles peuvent être le récepteur lui-même ainsi que ses co-régulateurs (Gioeli et al., 2002) (**figure n°33**). Il a été montré une activation de AR indépendante de la fixation de son ligand en réponse à des facteurs de croissance tels que l'EGF, l'IGF1 ou le KGF (*keratinocyte growth factor*) (Culig et al., 1994). Ainsi, une dérégulation des équilibres de ces molécules signalétiques ou de leurs protéines effectrices pourrait être impliquée dans l'acquisition de la croissance tumorale androgéno-indépendante.

La phosphorylation du récepteur des androgènes est impliquée dans différents processus tels que sa stabilité par une protection contre sa dégradation, une stabilisation des homodimères (Blok et al., 1998) ou encore son activité transactivatrice (Lee and Chang, 2003b; Rochette-Egly, 2003). Le récepteur a notamment été montré comme une cible des voies MAPK, PI3K ou encore de la voie PKC dans des cellules tumorales prostatiques (Wen et al., 2000; Yeh et al., 1999). Dans ce chapitre nous allons étudier quelques facteurs de croissance ou inducteurs supposés de la prolifération des cellules tumorales androgéno-indépendantes. La difficulté des études réalisées sur ces voies de signalisation résulte des multiples inter-connexions entre ces différentes voies et l'activation de plusieurs d'entre elles par un même ligand.



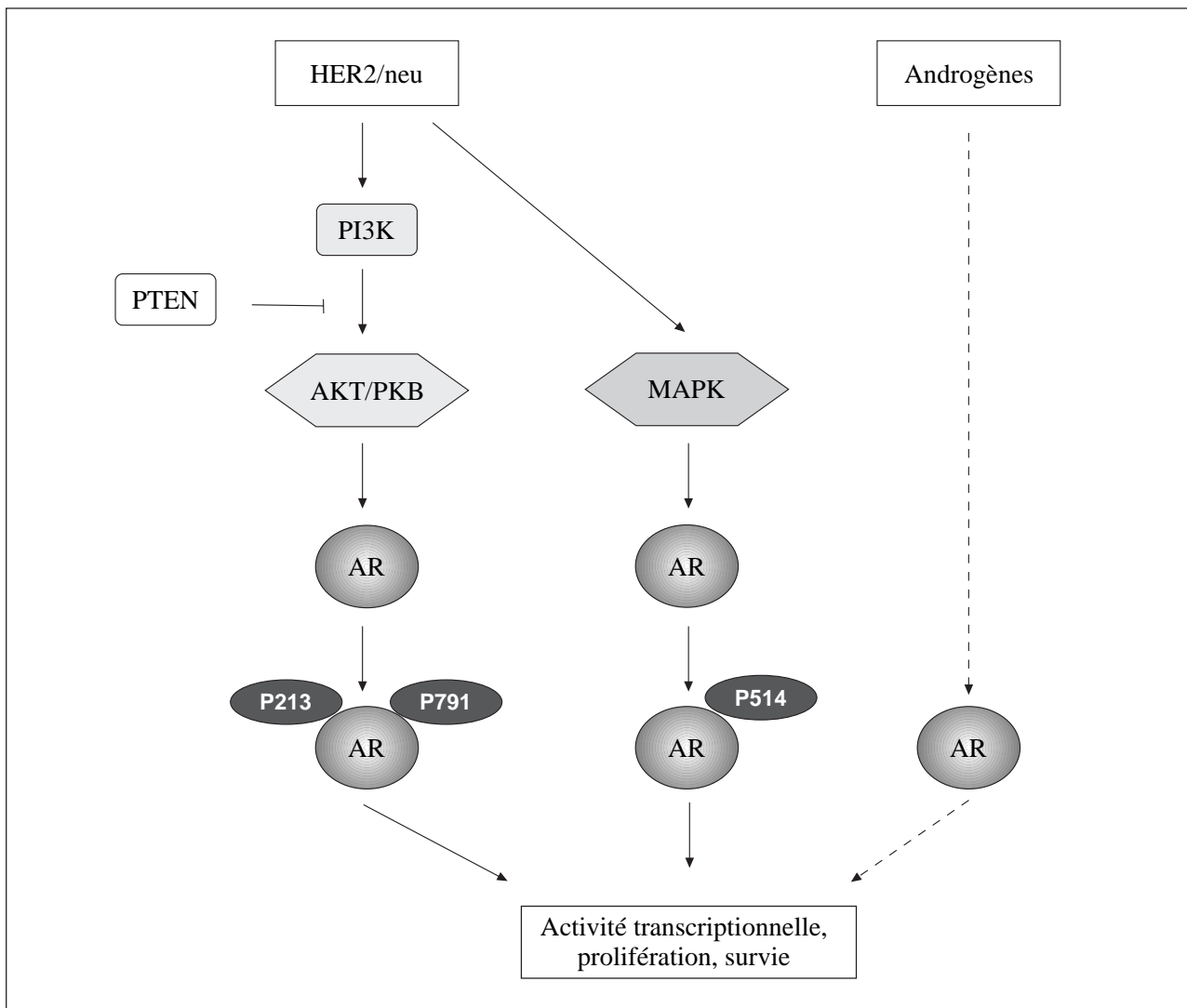
**Figure n°34: Boucle de production autocrine de facteurs de croissance dans les cellules épithéliales tumorales de la prostate.**

La production des facteurs de croissance au niveau de la prostate saine est essentiellement réalisée au niveau des cellules stromales sous l'action des androgènes. Dans une moindre mesure les cellules épithéliales produisent aussi des facteurs de croissance sous le contrôle de régulations paracrines initiées par les cellules stromales. En revanche, les cellules épithéliales tumorales ont la capacité de produire ces mêmes facteurs de croissance de façon auto-entretenu et stimulée par une boucle de régulation autocrine, favorisant ainsi leur croissance et leur prolifération. EGF: epidermal growth factor; TGF $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; IGF1: insulin like growth factor 1; bFGF: basic fibroblast growth factor.

#### a. L'EGF/ EGF-R/HER2.

L'EGF semble être un acteur majeur de la croissance des cellules prostatiques tumorales. En effet, les cellules épithéliales malignes de la prostate présentent une capacité accrue d'expression autocrine de l'EGF en regard des cellules saines, dépendantes de régulations paracrines, initiées par les cellules stromales (Culig et al., 1996; Scher et al., 1995) (*figure n°34*). Cette croissance auto-entretenu semble de plus, être accentuée dans les cellules de cancers hormono-résistants ou encore au niveau des cellules métastatiques et il existe une corrélation entre les taux d'EGF sécrété et la perte de différenciation des cellules au cours des processus de tumorigenèse (Fowler et al., 1988; Yang et al., 1993). De plus, des analyses sur des tumeurs localisées révèlent une plus forte accumulation des ARNm du récepteur de l'EGF EGF-R par rapport à des cellules épithéliales saines (Turkeri et al., 1994). Enfin, le blocage de la signalisation EGF-R par des anticorps spécifiques inhibe la prolifération de cellules cancéreuses *in-vitro* ainsi que celle de xénogreffes réalisées chez la souris (Fong et al., 1992; Prewett et al., 1996). Une étude récente s'est intéressée à la quantification du récepteur de l'EGF chez différents groupes de patients ayant subi une prostatectomie ou bien un traitement anti-androgénique ou encore présentant un cancer hormono-résistant (Di Lorenzo et al., 2002). Les résultats de cette étude ont mis en évidence une augmentation du niveau d'EGF-R au cours de la progression tumorale et surtout ont permis de faire une corrélation entre un niveau élevé d'EGF-R et l'acquisition de l'hormono-indépendance des tumeurs. Une autre étude basée sur la quantification d'EGF-R avant et après échappement rapporte la surexpression d'EGF-R dans 25% des cas en échappement hormonal (Bartlett et al., 2005). La stimulation de la phosphorylation de AR en réponse à l'EGF pourrait aussi être une cause majeure de la progression tumorale (Gioeli et al., 2002).

HER2/neu ou Erb2 est un récepteur à activité tyrosine kinase apparenté au récepteur de l'EGF. Néanmoins, HER2 est capable d'activer le signal de transduction en l'absence de fixation de tout facteur de croissance. La surexpression de HER2 dans des xénogreffes dont la croissance est dépendante des androgènes, entraîne leur conversion en cellules capables de proliférer indépendamment de la présence de l'hormone suite à une castration chez des souris (Craft et al., 1999b). Dans des cellules LNCaP, la transfection stable de HER2 se traduit par une forte activation de l'activité transcriptionnelle de AR sur son gène cible PSA (Yeh et al., 1999) (*figure n°35*). Cet effet passerait par l'activation de la voie MAPK et la phosphorylation de AR sur la Ser 514 puisqu'un inhibiteur de cette voie et que la mutation de la sérine 514 préviennent (en partie pour le mutant) l'effet de HER2. De plus, il y aurait un



**Figure n°35: Model d'activation du récepteur des androgènes par le récepteur Her2/neu dans des cellules tumorales prostatiques.**

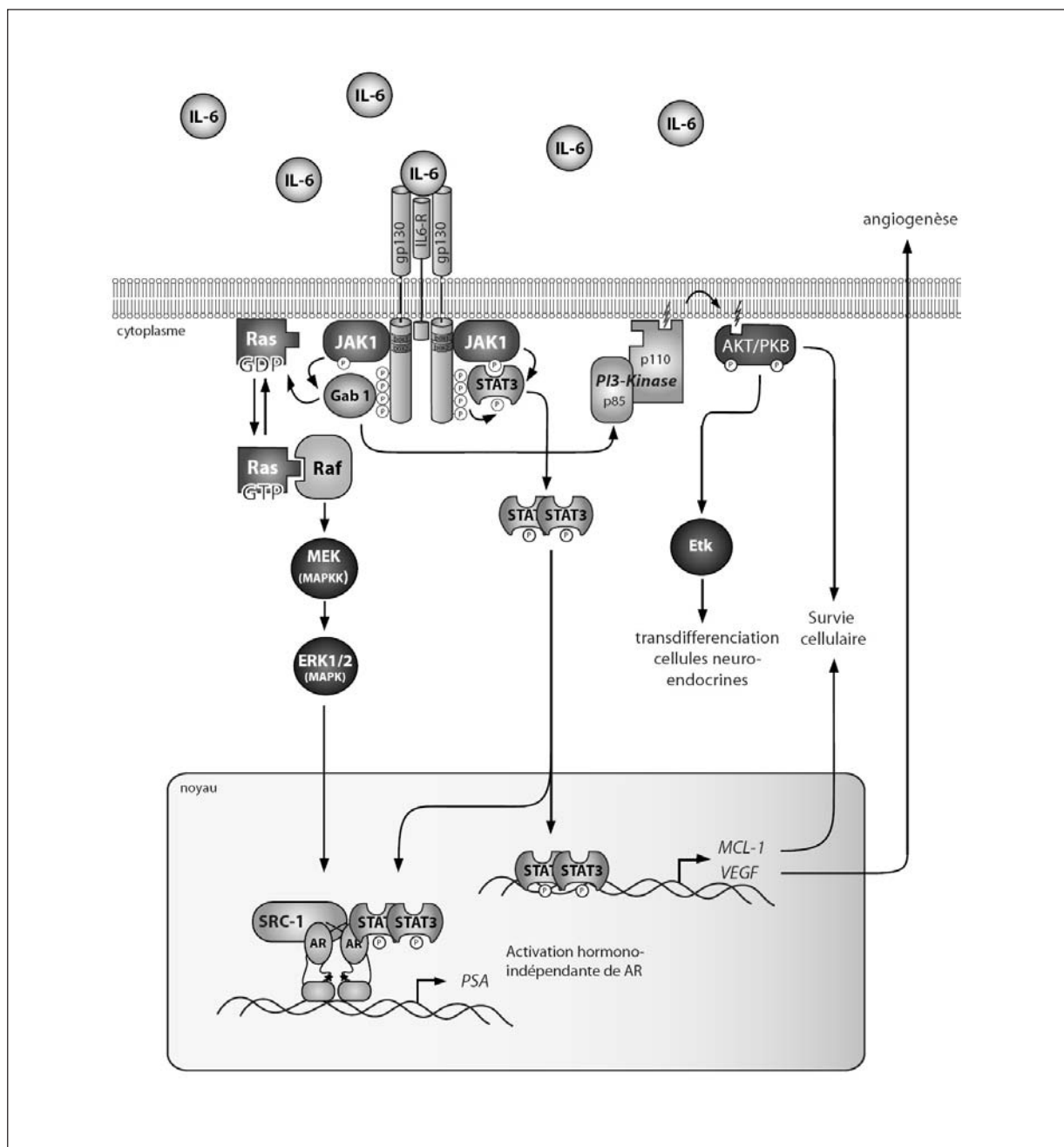
Le récepteur Her2/neu peut activer la voie de signalisation MAPKinase et ainsi induire une phosphorylation du récepteur des androgènes sur le résidu sérine 514. De plus, Her2/neu peut aussi activer la voie de survie PI3Kinase et induire la phosphorylation de AR sur les résidus sérine 213 et sérine 791 par la protéine kinase AKT. Ceci se traduit par une stimulation de l'activité transcriptionnelle de AR et par une survie accrue des cellules tumorales.

recrutement plus important de protéines co-régulatrices telles que ARA55 et ARA70 par AR en réponse à l'activation de HER2. Un tel mécanisme a aussi été décrit pour l'EGF qui par l'intermédiaire de la voie MAPK, favorise le recrutement de TIF2 dans des cellules dérivées d'une tumeur récurrente (Gregory et al., 2004). En outre, il semble que HER2 puisse aussi stimuler l'activité de AR par l'intermédiaire de la voie PI3K (Wen et al., 2000). Le récepteur des androgènes est en effet la cible directe de la kinase AKT qui par phosphorylation des résidus Ser 213 et Ser 791 induit l'activité transcriptionnelle de AR en absence de son ligand. Une étude de Signoretti et coll. révèle que HER2 est surexprimé au niveau des tumeurs chez 25% des patients non-traités, 59% des patients traités par hormonothérapie et 78% des patients en échappement hormonal (Signoretti et al., 2000). Des résultats similaires sont retrouvés dans une étude de Shi et coll. (Shi et al., 2001). L'étude de Bartlett et coll. directement basée sur les mêmes patients avant et après hormono-résistance, retrouve une surexpression de HER2 dans 25% des tumeurs hormono-résistantes (Bartlett et al., 2005). Ainsi, ce récepteur constitue une cible thérapeutique intéressante contre laquelle certains outils sont en cours de développement tels que l'anticorps anti-HER2 (Herceptin®), (Slamon and Pegram, 2001).

L'activation des voies MAPK et PI3K par le facteur de croissance EGF ou par HER2, pourrait ainsi cibler directement le récepteur des androgènes et ainsi induire son activité transcriptionnelle indépendamment de la présence de l'hormone par différents mécanismes dont le recrutement plus important de co-activateurs. De plus une activation constitutive de la kinase Ras, impliquée dans la voie MAPK, confère à des cellules LNCaP une hypersensibilité des cellules à l'hormone avec l'activation du PSA à de très faibles doses de DHT ainsi qu'une croissance des cellules en xénogreffes chez des souris castrées (Bakin et al., 2003). Ces deux voies de signalisation cellulaire, suractivées lors du passage des cellules en phase d'échappement hormonal, permettraient une croissance tumorale en présence de très faibles taux d'hormones, identiques à ceux qui persistent lors des traitements anti-hormonaux.

#### b. Les cytokines.

La cytokine IL6 (*interleukine 6*) est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération ou encore l'inhibition de croissance en fonction de l'origine tissulaire des cellules. Son activité intervient entre autre dans l'hématopoïèse, le métabolisme osseux ou encore la régulation du système immunitaire et inflammatoire



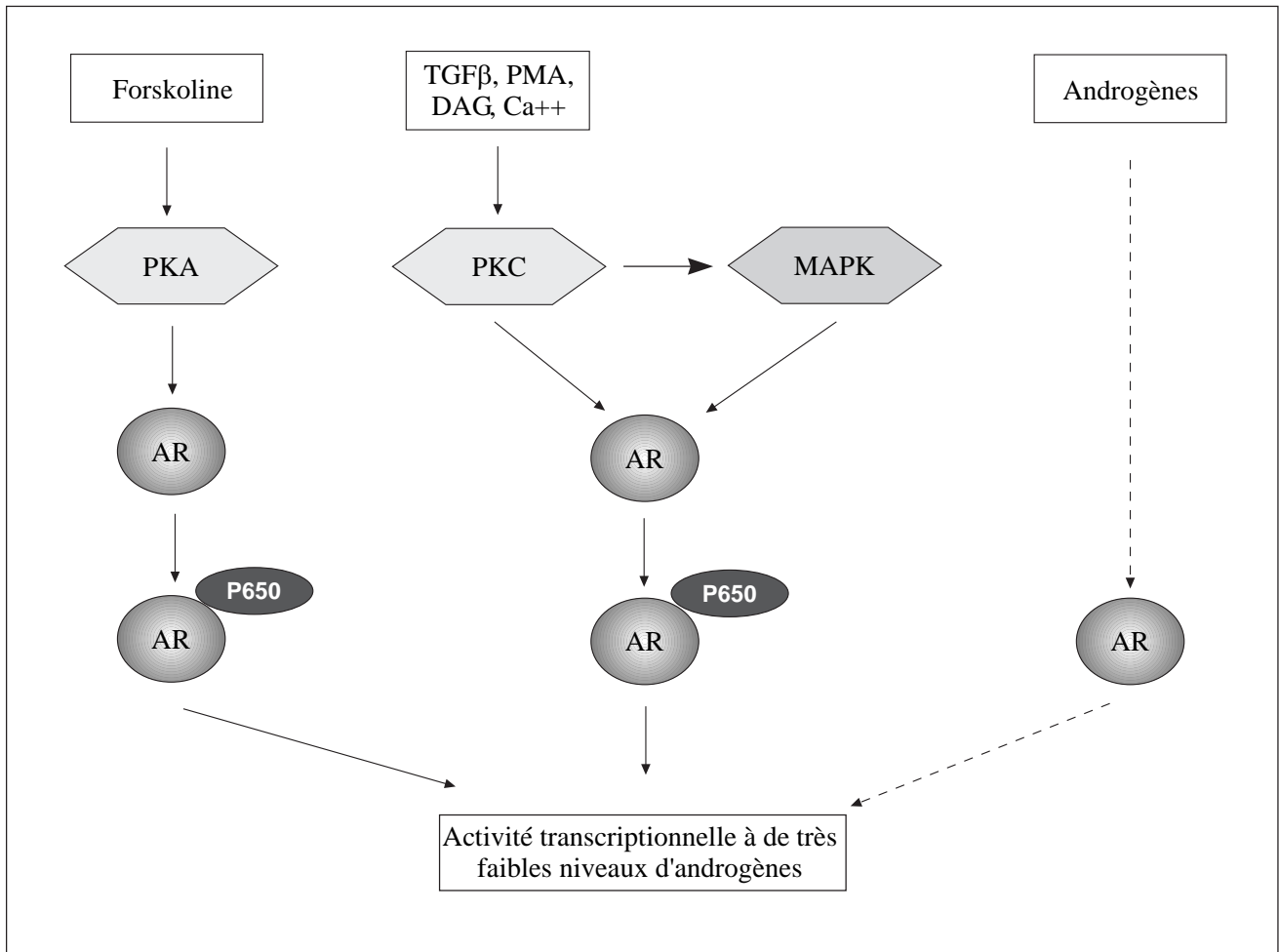
**Figure n°36: Cascades de transduction initiées au niveau du récepteur de l'interleukine 6 (IL6) dans les cellules épithéliales de la prostate.**

La stimulation du complexe IL6-R/gp130 active trois voies de signalisation majeures: 1-la voie JAK1/STAT3, 2- la voie des MAPKines. 3-la voie de la PI3Kinases. Le dimère STAT3 phosphorylé migre dans le noyau et active directement la transcription de gènes anti-apoptotiques (ex: MCL-1) et pro-angiogéniques (ex: VEGF). Il peut aussi interagir directement avec le récepteur des androgènes et participer à son activation en absence d'androgènes pour stimuler la transcription de ses gènes cibles. Le complexe IL6-R/gp130/JAK1 peut également recruter les initiateurs des voies MAPK et PI3K. Ceci conduit à l'activation de AR, à une stimulation de la prolifération, à la survie cellulaire et à la différenciation des cellules en cellules neuro-endocrines.

(Kamimura et al., 2003). L'IL6 est également supposée être impliquée dans la tumorigenèse et notamment celle de la prostate. Cette cytokine agit via un récepteur membranaire gp80 qui possède le domaine de reconnaissance du ligand et couplé à deux sous-unités gp130 (*figure n°36*). L'activation de gp130 va induire un recrutement et une phosphorylation des facteurs de transcription STAT3. L'IL6 peut aussi activer la voie des MAPK (Chen et al., 1999b; Qiu et al., 1998a) ou celle de la PI3K (Chung et al., 2000; Qiu et al., 1998b) dans des cellules tumorales de la prostate. Dans des cellules LNCaP, l'IL6 stimule l'activité transactivatrice de AR sur le gène *PSA* et ce en absence de son ligand (Ueda et al., 2002). Cet effet peut être renversé par l'utilisation d'un anti-androgène suggérant l'implication même du récepteur des androgènes. L'interleukine 6 induit une phosphorylation et ainsi une activation des MAPKs et de STAT3, qui se traduit par une interaction entre STAT3 et le récepteur des androgènes. Cette cascade d'activation résulte en une prolifération des cellules dans un milieu dépourvu d'hormones. L'action proliférative de l'IL6 a aussi été mise en évidence dans des modèles de xénogreffes chez des souris castrées (Lee et al., 2003a). Une immunolocalisation de l'IL6 révèle un marquage des cellules épithéliales basales saines qui est délocalisé au niveau des cellules épithéliales luminales cancéreuses (Hobisch et al., 2000). Enfin, plusieurs études permettent de faire une corrélation positive entre les taux d'IL6 circulants et l'acquisition de l'androgéno-indépendance des tumeurs (Drachenberg et al., 1999; Hoosein et al., 1995; Wise et al., 2000). En effet, les patients en hormono-résistance ont des taux plasmatiques d'IL6 mais aussi d'IL4 ou d'IL10 significativement plus élevés que les patients qui présentent un cancer hormono-dépendant. L'IL4 possède aussi la capacité d'activer la transcription dépendante de AR indépendamment de la présence de son ligand ou à le rendre sensible à de très faibles doses d'hormones (Lee et al., 2003b). Les auteurs démontrent que cet effet est dépendant de l'activation de la voie PI3K.

#### c. Le facteur de croissance IGF-1.

L'IGF-1 est un facteur qui initie des effets mitogéniques et anti-apoptotiques par l'intermédiaire de son récepteur transmembranaire IGF-1R (Baserga et al., 1997). L'activation de ce dernier permet en cascade une stimulation des voies MAPK et PI3K. Dans le sérum, l'IGF1 est lié à une famille de protéines, les IGFBPs (*IGF binding protein*) ; certaines sont capables d'inhiber, d'autres de favoriser l'activité d'IGF1 (LeRoith and Roberts, 2003). Une étude de Bubendorf et coll. rapporte la surexpression d'IGFBP-2 au niveau de 100% des



**Figure n°37: Model d'activation du récepteur des androgènes par la protéine kinase A et la protéine kinase C dans des cellules tumorales prostatiques.**

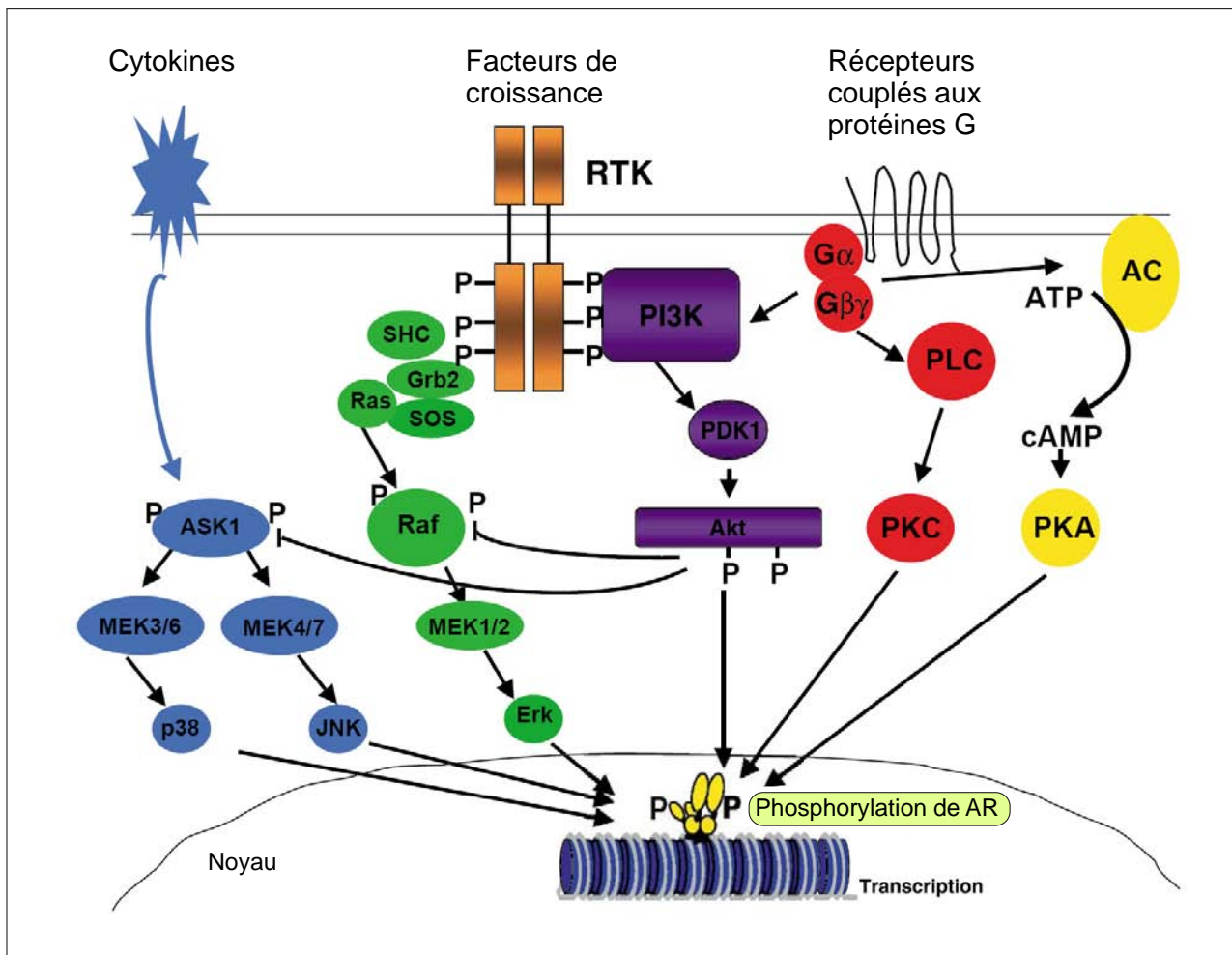
L'activation de la PKA par la forskoline ou de la PKC par le TGFβ (transforming growth factor β), le PMA (12-myristate 13-acétate), le DAG (diacylglycérol) ou le calcium intra-cellulaire induisent une phosphorylation du résidu sérine 650 et une induction de l'activité transcriptionnelle de AR en absence de son ligand. De plus, la PKC interagit avec la voie MAPKinase qui peut également activer le récepteur des androgènes par phosphorylation.



biopsies de patients avec une tumeur hormono-résistante, 36% avec une tumeur primaires et n'est pas retrouvé au niveau de tissu prostatique sain (Bubendorf et al., 1999). La protéine IGFBP-2 a été montrée comme un activateur d'IGF1 dans des cellules épithéliales de prostate en culture (Cohen et al., 1991). On peut aussi mentionner la corrélation qui existe entre l'acquisition de l'androgéno-indépendance de tumeurs en xénogreffes après castration des animaux, et une sur-expression des messagers d'IGFBP-5 (Miyake et al., 2000). En revanche, la progression des cancers vers une phase d'androgéno-indépendance, dans des modèles de xénogreffes de souris normales ou castrées, a été corrélée avec une réduction de l'expression de IGFBP-3, qui elle, est connue pour inhiber l'activité d'IGF1 (Nickerson et al., 2001). Cet évènement est de plus, associé à un niveau élevé des ARNm d'IGF1. Des souris transgéniques exprimant l'IGF1 spécifiquement au niveau des cellules épithéliales basales de la prostate développent des néoplasies puis des adénocarcinomes (DiGiovanni et al., 2000). L'IGF1 favoriserait plutôt la prolifération que la survie cellulaire puisque l'étude des tumeurs, conduite 10 jours après castration, révèle un taux d'apoptose identique à celui observé chez les animaux sauvages. Chez l'homme, plusieurs études prospectives ont permis de corréler de hauts niveaux d'IGF1 plasmatiques à un risque plus élevé (1,7 à 4,3 fois) de développer un cancer de la prostate (Chan et al., 1998; Harman et al., 2000; Stattin et al., 2000). Il est intéressant de noter que l'IGF1 a la capacité d'initier la transcription dépendante du récepteur des androgènes en absence de son ligand dans des cellules tumorales prostatiques LNCaP, PC3 et DU145 (Culig et al., 1994; Kollara et al., 2003). La surexpression du facteur IGF1 ou la dérégulation de ses partenaires IGFBPs dont les niveaux peuvent être dépendants de la présence des androgènes, participent probablement au basculement des cellules en hormono-thérapie vers une croissance androgéno-indépendante.

#### d. Les protéines kinases PKC et PKA.

La protéine kinase C (PKC) pourrait également être impliquée dans l'acquisition de l'androgéno-indépendance. La PKC est une sérine-thréonine kinase qui peut être activée par le TGF $\beta$ , le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou encore par le calcium ou le diacylglycérol (Lahn et al., 2004). L'activation de la PKC par le PMA s'accompagne d'une phosphorylation de AR sur le résidu sérine 650 dans des cellules LNCaP (Gioeli et al., 2002) et permet une induction de l'activité transcriptionnelle de AR indépendamment de la présence de son ligand (Darne et al., 1998) (*figure n°37*). Des taux anormalement élevés de l'isoforme



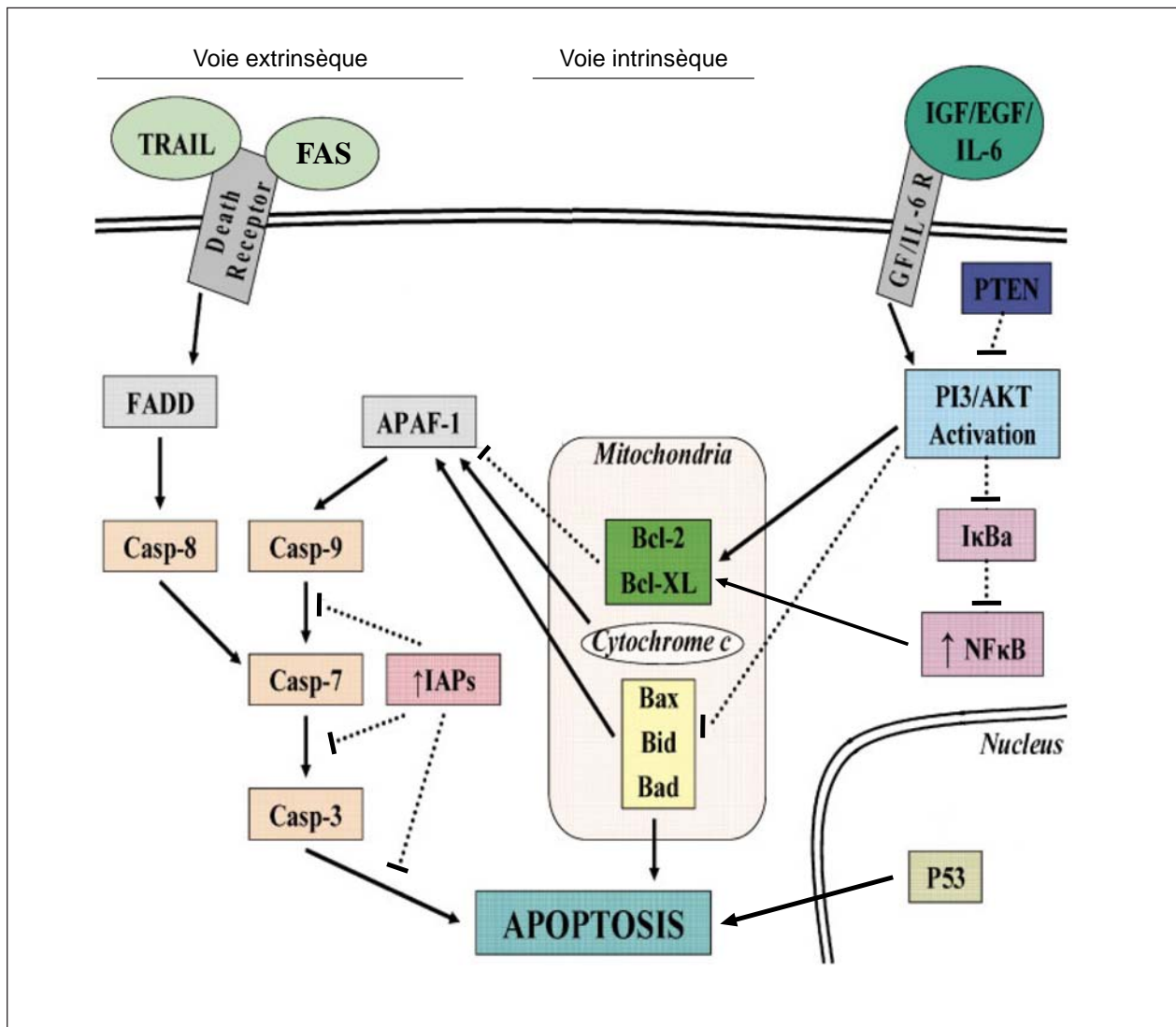
**Figure n°38: Activation du récepteur des androgènes par différentes voies de signalisation.**

Le récepteur des androgènes peut être activé dans le cancer de la prostate par plusieurs voies de signalisation intra-cellulaires. Ces voies sont celles des cytokines en bleu qui activent les kinases Jun (JNK) et p38, celles des facteurs de croissance à l'origine de l'activation des MAP Kinases en vert et de la voie PI3K en violet, ou encore celles de la PKC en rouge et de la PKA en jaune après activation d'un récepteur couplé aux protéines G. Il en résulte une phosphorylation du récepteur des androgènes et une activation de la transcription. Ces différents événements peuvent se mettre en place indépendamment de la présence du ligand de AR et participer à l'acquisition d'une croissance androgéno-indépendante des cellules tumorales prostatiques. ASK1: apoptosis-stimulating kinase 1; JNK: jun kinase; RTK: récepteur à activité tyrosine kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; PDK: 3-phosphoinositol-dépendant protein kinase; Akt: protein kinase B; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; AC: adénylate cyclase. cAMP: cyclic adenosine monophosphate; PKA: protein kinase A. D'après Rochette-Egly, 2002.

PKC $\alpha$  ont été retrouvés dans des tumeurs de la prostate (Basu, 1993). Cette isoforme n'est présente qu'en faible quantité dans des cellules androgéno-dépendantes (LNCaP) alors que son niveau est beaucoup plus élevé dans des cellules androgéno-indépendantes de type PC3 ou DU145 (Powell et al., 1996). Une étude de Lahn et coll. révèle une diminution de la PKC $\alpha$  au niveau de tumeurs chez des patients qui subissent un traitement anti-hormonal au cours des 3 à 6 premiers mois, puis une ré-augmentation de ce taux lorsque les cellules tumorales deviennent hormono-résistantes (Lahn et al., 2004). Enfin, les PKC peuvent interagir avec la voie des MAPK en activant la protéine Ras (Mackay and Twelves, 2003). Dans des cellules tumorales de prostate PC3 et DU145, l'ajout de l'anti-androgènes TPA se traduit par une phosphorylation et donc une activation des kinases erk1/2 (MAPKK 1/2) qui peut être spécifiquement abrogée par l'utilisation d'un inhibiteur de l'isoforme PKC $\alpha$  (Stewart and O'Brian, 2005). Ces effets passent par une activation de l'EGF-R et laissent ainsi supposer une participation de la PKC $\alpha$  dans l'acquisition d'une forte activité de la voie MAPK au niveau des cancers en échappement hormonal.

Il faut aussi noter que le récepteur des androgènes peut être phosphorylé en réponse à la forskoline qui est un activateur de la protéine kinase A (PKA) (Gioeli et al., 2002). De plus il a été montré une induction de l'activité transcriptionnelle de AR indépendamment de la présence de son ligand par la forskoline ou par une surexpression de la sous-unité catalytique de la PKA (Nazareth and Weigel, 1996; Sadar, 1999; Ueda et al., 2002). Cet effet est inversé par l'utilisation d'un peptide inhibiteur de la PKA ainsi que par un anti-androgène tel que le bicalutamide. Ceci suggère une participation directe du récepteur des androgènes dans ce mécanisme.

De ces différentes études épidémiologiques ou expérimentales, il ressort un faisceau d'arguments qui impliquent les facteurs de croissance ou les cytokines dans la pathologie prostatique. Un grand nombre de ces facteurs ont la propriété d'activer le récepteur des androgènes alors que celui-ci n'est pas lié à son ligand, ou encore de le sensibiliser à de très faibles niveaux d'androgènes (*figure n°38*). Cette activation est menée par différentes voies de signalisation qui présentent entre elles des inter-connexions multiples et complexes. De plus, ces différents facteurs sont fortement associés à la prolifération cellulaire. Ces arguments laissent ainsi supposer que les désordres de ces différentes voies, si elles ne sont pas les seules responsables, pourraient néanmoins jouer un rôle dans l'acquisition d'une croissance tumorale après échappement hormonal.



**Figure n°39: Voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque, protéines pro- et anti-apoptotiques impliquées dans le cancer de la prostate.**

L'induction de l'apoptose peut se faire par la voie extrinsèque initiée par les récepteurs de mort TRAIL-R et FAS-R qui induisent une activation des caspases et ainsi un clivage de leurs substrats. L'autre voie est la voie intrinsèque qui implique dans la mitochondrie les protéines pro-apoptotiques Bax, Bid et Bad, le relargage du cytochrome c et l'activation des caspases en cascade. Sur ce schéma sont également représentées plusieurs protéines dont la dérégulation a été corrélée à une résistance accrue des cellules tumorales prostatiques à l'apoptose. Ces événements sont la surexpression des protéines mitochondriales anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL, la surexpression du facteur de transcription NF-κB qui régule positivement le niveau d'accumulation de Bcl-2 et Bcl-XL, la perte ou mutation du suppresseur de tumeur p53 qui joue un rôle primordial dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, la perte de la protéine PTEN qui régule négativement la voie de survie PI3K et la surexpression des protéines IAPs qui protègent la cellule contre l'apoptose. TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand; FADD, fas associated death domain; APAF1, apoptotic protease activating factor-1; IAPs, cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins; Casp., caspase; NF-κB, nuclear factor κB; IκB, inhibitor κB; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; Bcl-2, B-cell leukemia/lymphoma 2; Bcl-XL, Bcl-2-like 1 protein long form; IGF, insulin like growth factor; EGF, epidermal growth factor; IL6, interleukine 6. Modifié d'après McKenzie et Kyprianou, 2006.

### 3. Autres mécanismes impliqués.

La reprise de croissance des cellules tumorales après un traitement anti-hormonal, ou la résistance à la chimiothérapie, peuvent aussi s'expliquer par une résistance accrue des cellules à l'apoptose ou bien encore par une sélection clonale induite par ces mêmes traitements.

#### a. Résistance accrue des cellules cancéreuses à l'apoptose.

Alors que la croissance et le maintien des organes sont régulés par une balance entre la prolifération et la mort cellulaire programmée par apoptose, les cellules cancéreuses exhibent une capacité accrue de prolifération et une résistance plus importante à l'apoptose. Le cancer de la prostate n'échappe pas à ce schéma (Evan and Vousden, 2001; Tu et al., 1996).

Dans une cellule, l'induction de l'apoptose passe par deux voies (*figure n°39*):

- la voie extrinsèque qui mobilise des récepteurs de mort membranaires tels que le récepteur Fas (*FAS-R*) ou encore le récepteur TRAIL (*TRAIL-R : TNF-related apoptosis inducing ligand receptor*). Ces récepteurs peuvent activer des protéases, les caspases, qui par clivage de leurs substrats entraînent la mort de la cellule (Debatin and Krammer, 2004).
- La voie intrinsèque est initiée par des stress cellulaires ou des dommages à l'ADN, ce qui mobilise les protéines mitochondriales de la famille Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) et le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Ceci se traduit par une activation de la caspase 9 principalement (Leist and Jaattela, 2001).

Il semble aussi y avoir des inter-connexions entre ces deux voies qui ne sont donc pas totalement indépendantes. De nombreuses dérégulations dans les niveaux d'expression ou d'activité de plusieurs des protéines pro- ou anti-apoptotiques sont impliquées dans la pathologie tumorale prostatique et notamment dans l'acquisition d'une croissance indépendante de la présence des androgènes après hormono-thérapie.

Plusieurs études *in-vitro* et *in-vivo* ont établi une corrélation entre la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou des membres de sa famille et l'agressivité de la tumeur prostatique (Kajiwara et al., 1999; McCarty, 2004). Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL (*Bcl-2-like*

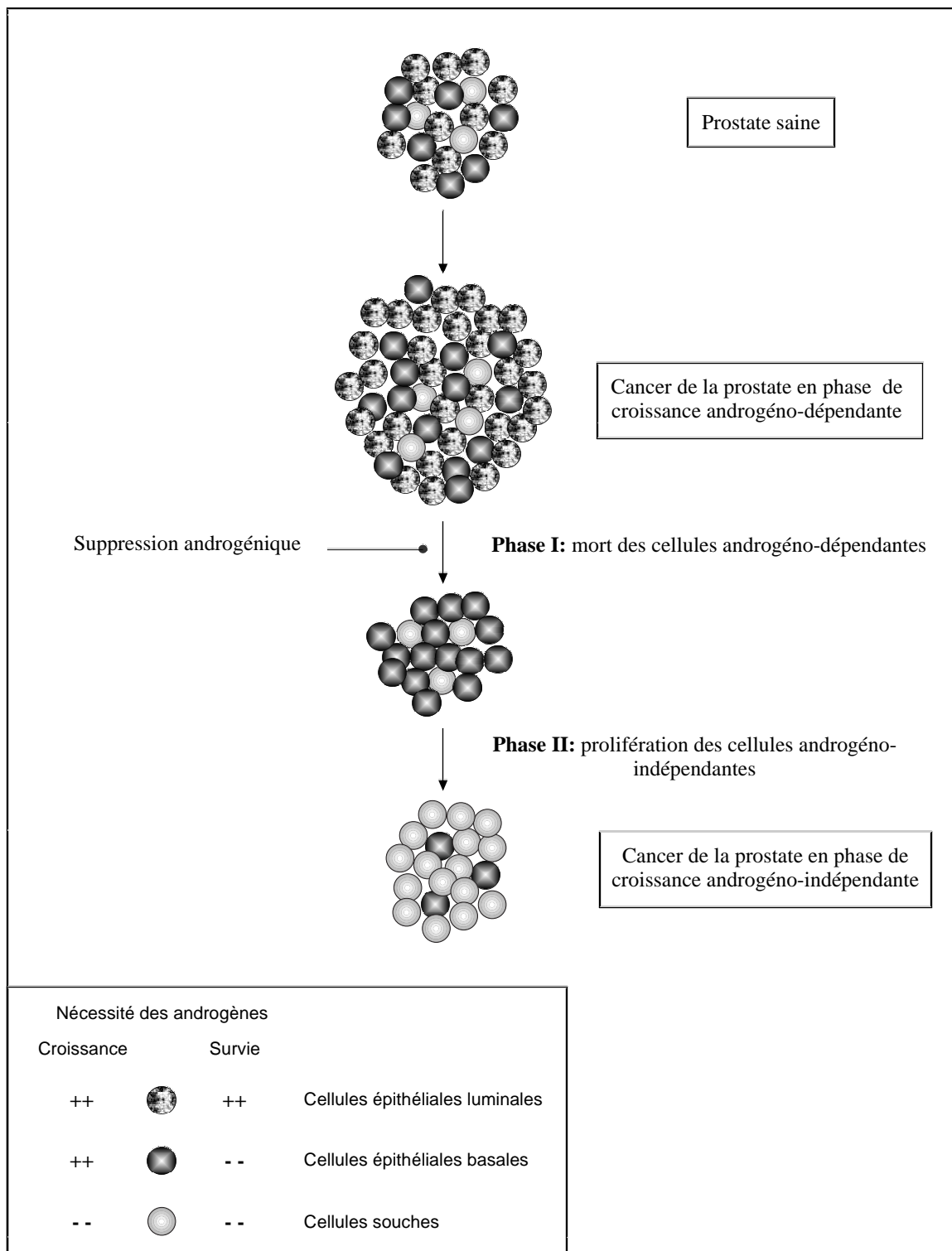


*l protein long form*) confèrent une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie (McCarty, 2004). La protéine Bcl-2 est surexprimée dans les cancers hormono-résistants chez le rat (McCarty, 2004) et a été directement liée à une croissance cellulaire en milieu dépourvu d'androgènes (Kajiwara et al., 1999). Enfin, cette protéine est surexprimée dans 77% des cancers de la prostate hormono-résistants en comparaison de 32% dans des tumeurs androgéno-sensibles (Westin et al., 1995).

Une autre protéine anti-apoptotique impliquée dans le cancer de la prostate est NF- $\kappa$ B. Son activité anti-apoptotique passe par sa capacité à réguler directement l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-xL, ce qui conduit à une inhibition de l'apoptose mitochondriale (Chakraborty et al., 2001). Néanmoins elle interfère aussi avec la voie extrinsèque activée par le ligand de FAS (Shukla and Gupta, 2004). Une activation constitutive de NF- $\kappa$ B est fréquente dans une grande variété de tumeurs. Son activité est notamment très forte dans des lignées de cellules androgéno-indépendantes mais aussi dans des tumeurs prostatiques hautement agressives et au niveau des lésions métastatiques (Ismail et al., 2004; Ross et al., 2004). De plus, ce haut niveau d'expression de NF- $\kappa$ B a aussi été corrélé avec une résistance à la chimio et radiothérapie (Suh and Rabson, 2004).

Le suppresseur de tumeur p53 est une protéine clef dans le processus apoptotique en plus de son rôle dans le cycle cellulaire (Kastan et al., 1995). Des mutations au niveau de son gène sont retrouvées dans 40 à 50% de tous les cancers humains (Soussi et al., 2000). Alors que dans les cancers primaires de la prostate bien différenciés, p53 est relativement peu muté, le taux de mutation augmente littéralement au niveau des lésions métastatiques et des tumeurs hormono-résistantes (Navone et al., 1993). Dans des cellules tumorales prostatiques hormono-sensibles, la perte de p53 se traduit par le développement d'une hormono-résistance (Burchardt et al., 2001; Scherr et al., 1999). Une altération de l'activité de p53 se traduit également par une résistance à la radiothérapie des tumeurs prostatiques alors que la surexpression d'une forme sauvage de p53 en modèles expérimentaux sensibilise de nouveau les cellules à un traitement en induisant une apoptose (Hernandez et al., 2003; Pisters et al., 2004).

La protéine PTEN est une phosphatase qui joue également un rôle majeur dans l'apoptose par sa capacité à inhiber la voie de survie cellulaire PI3K. La perte de PTEN est un évènement fréquent dans les tumeurs prostatiques résistantes aux traitements anti-hormonaux et peu différenciées, et se traduit par une activation constitutive de la voie PI3K (Davies et al., 1999). Alors que l'inactivation de PTEN est présente dans seulement 10 à 15% des cancers



**Figure n°40: Hypothèse de l'acquisition de la croissance androgéno-indépendante des cancers prostatiques après ablation androgénique.**

Le tissu prostatique est composé de trois types cellulaires représentés dans l'encadré. Le développement d'un cancer de la prostate se caractérise par une croissance anarchique des cellules épithéliales, principalement luminales et la croissance de la tumeur est androgéno-dépendante. Après castration réalisée dans le cadre d'une thérapie hormonale, on observerait une mort des cellules épithéliales luminales dépendantes des androgènes pour leur croissance et leur survie: phase I. Dans un deuxième temps, les cellules souches non dépendantes des androgènes auraient un avantage de croissance sur les cellules épithéliales basales dû à l'incapacité de ces dernières de proliférer en absence d'androgènes: phase II. La tumeur serait alors en phase de croissance androgéno-indépendante.



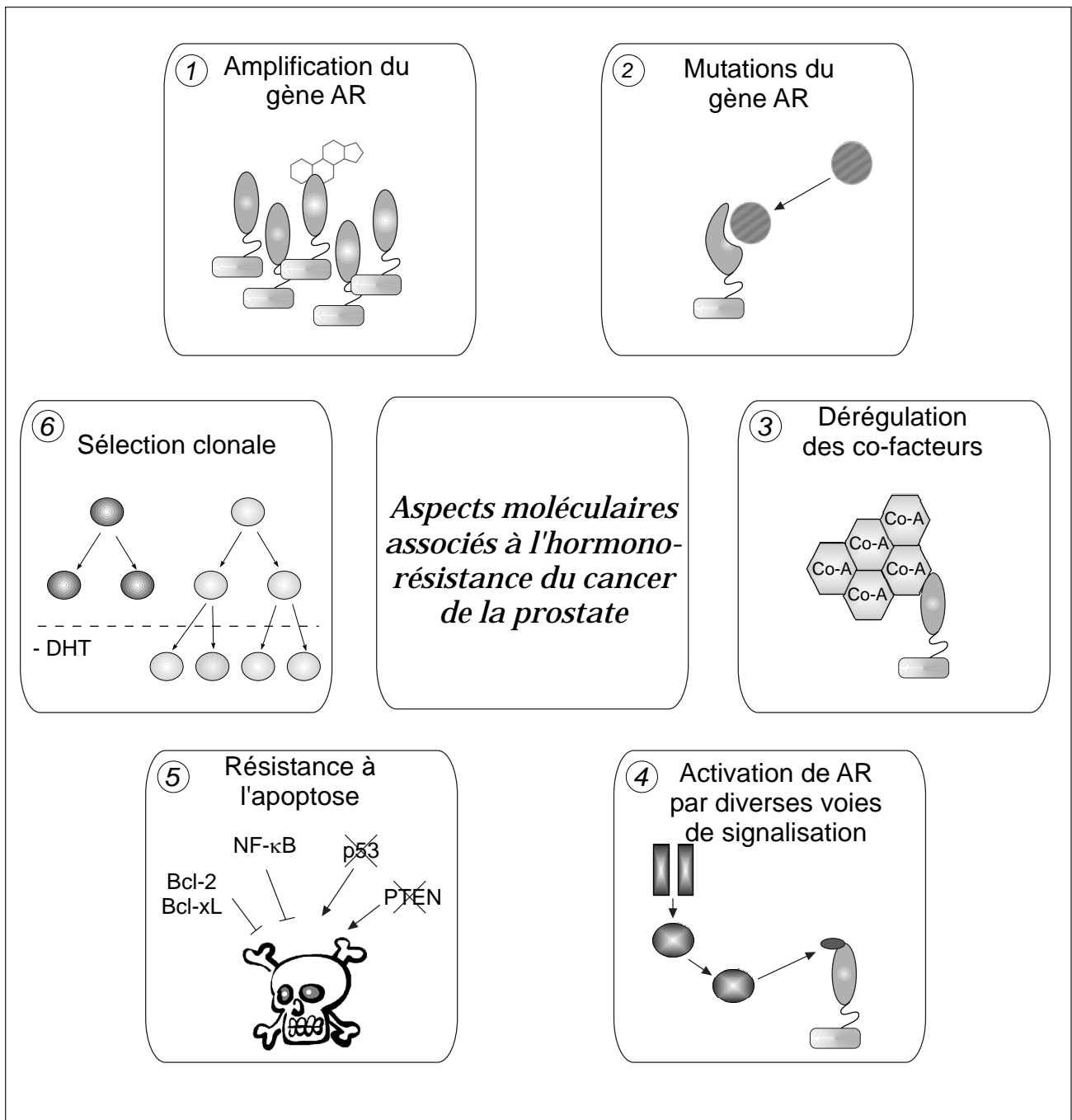
primaires, sa perte est détectée dans 30 à 50% des cancers hormono-résistants et dans 60% des modèles de xénogreffes dérivées de cellules métastatiques (Pfeil et al., 2004; Wang et al., 2003). La perte de PTEN est aussi associée à une résistance à la chimiothérapie et à la progression du cancer après une longue période de privation androgénique (Ghosh et al., 2003; Yuan and Whang, 2002). De nouvelles thérapies basées sur la restauration de PTEN sont actuellement en cours d'étude dans des modèles de xénogreffes.

Enfin, il faut noter l'existence d'une famille d'inhibiteurs de caspases dont l'augmentation de l'expression protège la cellule de l'apoptose : ces protéines sont les IAPs (*cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins*) (Schimmer, 2004; Yuan and Whang, 2002). Des taux élevés d'IAPs ont été mis en évidence chez des modèles animaux présentant des tumeurs prostatiques mais aussi au niveau de biopsies humaines pour lesquelles le tissu sain n'exprimait que de faibles niveaux d'IAPs (Krajewska et al., 2003). Néanmoins, cette augmentation est détectable dès le stade de néoplasie intra-épithéliale. Une inhibition d'un des membres (XIAP) augmente la sensibilité de cellules prostatiques hormono-résistantes à la chimiothérapie (Amantana et al., 2004). La participation des IAPs dans l'acquisition de l'hormono-résistance reste encore à déterminer.

#### b. Sélection clonale.

Une hypothèse visant à expliquer l'acquisition de la croissance androgéno-indépendante est basée sur l'existence de différents types de cellules qui composent la prostate (Craft et al., 1999a).

- Le premier type serait des cellules nécessitant les androgènes pour leur croissance et leur survie (androgéno-dépendantes) et correspondrait aux cellules sécrétrices de l'épithélium.
- Le deuxième type serait des cellules nécessitant des androgènes pour leur croissance mais non pour leur survie (androgéno-sensibles) et correspondrait aux cellules basales de l'épithélium.
- Enfin, il existerait des cellules ne nécessitant pas les androgènes ni pour leur croissance, ni pour leur survie (androgéno-indépendantes) et qui pourraient correspondre à des cellules souches.



**Figure n°41: Synthèse des différents mécanismes moléculaires associés à l'hormono-résistance du cancer de la prostate.**

Après privation androgénique, les cancers prostatiques connaissent une phase de croissance androgéno-indépendante: on dit qu'ils sont hormono-résistants. Plusieurs désordres moléculaires pourraient être responsables de cet échappement: 1- une amplification du gène AR conduisant en une élévation de son niveau d'accumulation protéique et son activation par de très faibles niveaux d'androgènes. 2- Des mutations du gène AR conduisant à son activation par des ligands non-androgéniques. 3- Une dérégulation des co-facteurs de AR induisant son activité transcriptionnelle de façon non contrôlée. 4- Une activation de AR indépendante de son ligand par des voies de signalisation intra-cellulaires telles que la voie PI3Kinase, MAPKinase, de la PKA ou de la PKC. 5- Une résistance accrue des cellules à l'apoptose avec une surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, NF-κB ou une perte de protéines telles que p53 ou PTEN. 6- Une sélection clonale de cellules androgéno-indépendantes pour leur croissance et leur survie après privation androgénique.

En se basant sur le passage successif de cellules en xénogreffes chez des souris castrées, les auteurs formulent l'hypothèse suivante : le passage de la phase de croissance androgéno-dépendante à androgéno-indépendante se ferait en deux phases successives (*figure n°40*). Alors que la xénogreffe serait constituée des trois types de cellules, la castration entraînerait dans un premier temps, une mort des cellules androgéno-dépendantes tel que cela est observé pour les cellules épithéliales sécrétrices au cours de l'hormono-thérapie (phase I). A ce stade, la tumeur reste toujours sensible à la présence d'androgènes de substitution. La phase II consisterait en un avantage de croissance pour les cellules androgéno-indépendantes par rapport aux cellules androgéno-sensibles qui ne pourraient plus se renouveler en absence d'androgènes. En diluant les cellules de façon limite, les auteurs estiment le nombre de ces cellules androgéno-indépendantes à 1 pour  $10^5$  à  $10^6$  cellules androgéno-dépendantes.

Une autre hypothèse en marge de celle de la sélection clonale est celle de l'adaptation. Le retrait des androgènes résulterait en une pression de sélection qui n'autoriserait que la croissance de cellules ayant subi des altérations d'ordre génétique favorables à une acquisition de l'androgéno-indépendance. Néanmoins, ces deux théories ne sont pas incompatibles et pourraient permettre, en partie seulement, d'expliquer l'origine des tumeurs en échappement hormonal.

Ce dernier chapitre nous a permis de mieux apprécier l'importance des androgènes et surtout de leur médiateur AR dans la physiopathologie. En effet, nous avons vu qu'un défaut de mise en place de la signalisation androgénique ou au contraire une induction accrue de l'activité de AR sont associés à différents processus physio-pathologiques. De ces différentes affections, celle qui a la plus forte prévalence et qui est associée à la plus forte mortalité est sans aucun doute la carcinogenèse prostatique. Bien que les recherches fondamentales ou cliniques sur cette pathologie aient permis d'élucider un certain nombre de mécanismes moléculaires ou endocriniens associés à la mise en place et à la progression des tumeurs prostatiques (*figure n°41*), elle reste encore difficilement maîtrisable à un stade avancé, compte tenu de la complexité des réseaux mis en jeu et les causes multifactorielles de la carcinogenèse. Il apparaît donc que le traitement du cancer de la prostate doit être abordé par une combinaison de différentes approches thérapeutiques.



\*\*\*\*\*

## *Présentation du sujet*

\*\*\*\*\*



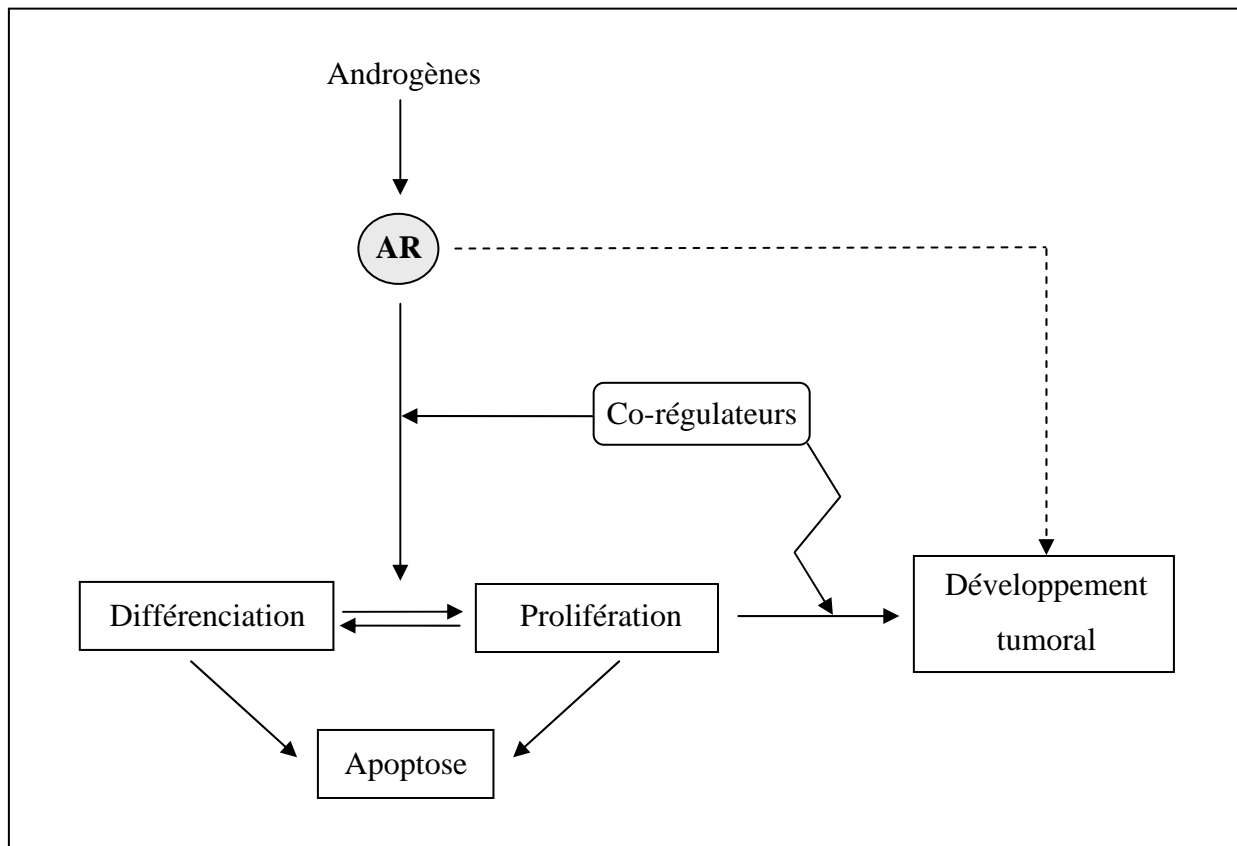
L'étude bibliographique que nous venons de parcourir met en évidence trois points majeurs concernant les androgènes :

- Les androgènes sont des hormones stéroïdes nécessaires au développement et au maintien des structures de l'appareil génital mâle. Ainsi, ces hormones contrôlent la maturation structurale de ces tissus mais assurent aussi leurs fonctions. De plus, les androgènes participent à la physiologie d'autres organes et tissus du corps humain. Le message initié par ces hormones est transmis à la cellule par l'intermédiaire d'un récepteur qui possède une activité de facteur de transcription et d'inducteur de voies de signalisation cytosoliques alternes.
- L'activité du récepteur des androgènes est modulée à de multiples niveaux par son interaction avec des protéines co-régulatrices. Ces protéines peuvent contrôler positivement ou négativement la capacité du récepteur des androgènes à initier la transcription de gènes cibles. Les mécanismes mis en jeu passent par une régulation de sa disponibilité, de sa localisation, de son propre recrutement sur l'ADN et de sa capacité à recruter d'autres facteurs impliqués dans l'activation de la transcription.
- La signalisation androgénique connaît des perturbations d'origine et d'intensité variables. Ces dernières sont souvent associées à des désordres de l'activité du récepteur des androgènes, ne lui permettant plus de transmettre le signal hormonal ou au contraire faussant le message initial. Elles peuvent aussi bien toucher le récepteur lui-même que l'ensemble des acteurs qui régulent son activité. Une des pathologies en grande partie associée à un défaut de la signalisation androgénique est le cancer de la prostate, qui touche en France un homme sur sept.





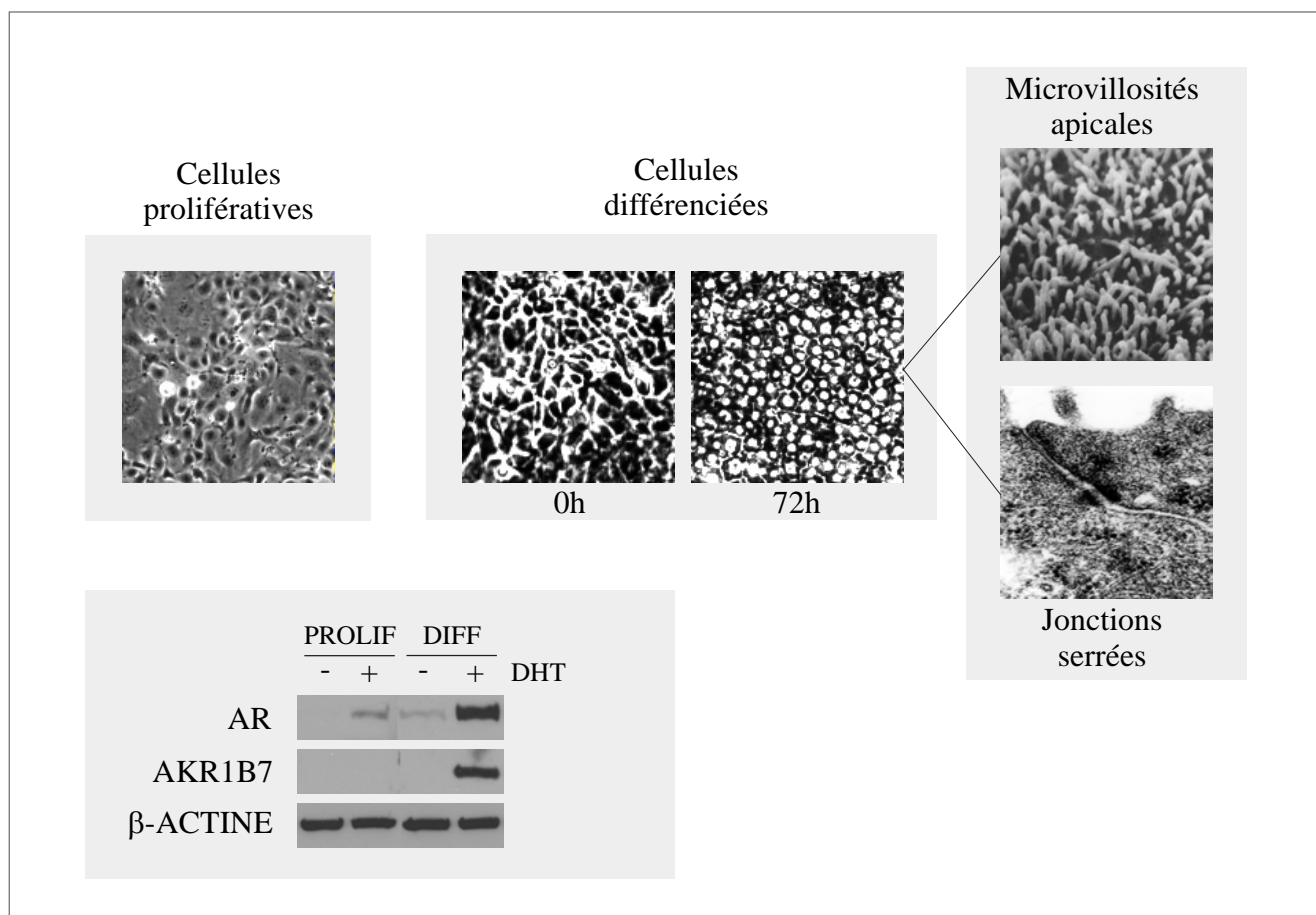
Si l'on se focalise sur le contrôle de l'activité du récepteur des androgènes par son interaction avec des co-régulateurs, il est possible de réaliser le schéma suivant :



Ainsi, les androgènes, par l'intermédiaire de leur récepteur et de ses partenaires protéiques sont largement impliqués dans la physiologie de leurs organes cibles. La perturbation des équilibres mis en place dans une situation physiologique peut être à l'origine de l'évolution de cette dernière vers une situation pathologique.

Dans cette problématique, notre étude a consisté :

- dans un premier temps, à identifier des protéines interagissant avec le récepteur des androgènes dans cellules androgéno-sensibles au cours des processus cellulaires fondamentaux de prolifération et de différenciation.
- dans un deuxième temps, à étudier la capacité des partenaires identifiés à réguler l'activité du récepteur des androgènes, et leur représentation, dans le contexte de la pathologie tumorale prostatique.



**Figure n°42: Modèle de différenciation de la lignée VDEC: *Vas Deferens Epithelial Cells*.**

Les cellules épithéliales sont dérivées de cultures d'explants de canaux déférents de souris prépubères. Les cellules sont capables de proliférer et de se différencier lorsqu'elles sont ensemencées à confluence sur une membrane microporeuse qui permet l'accès des facteurs du milieu de culture aux membranes basolatérales. La différenciation est associée à la polarisation des cellules qui devient homogène 72 heures après ensemencement des cellules. On observe un changement de morphologie de la monocouche cellulaire. D'un point de vue structural, les cellules acquièrent des microvillosités apicales et des jonctions cellulaires serrées (zonula occludens et desmosomes). Les cellules épithéliales sont androgéno-sensibles et leur différenciation est associée à une augmentation de l'accumulation du récepteur des androgènes et de sa protéine cible AKR1B7 qui est un marqueur de l'action des androgènes *in-vivo*.

Pour aborder la recherche de partenaires du récepteur des androgènes, nous avons utilisé un modèle de cellules épithéliales androgéno-sensibles qui reproduit en culture la maturation structurale et fonctionnelle d'un épithélium.

***Présentation du modèle de différenciation des cellules épithéliales androgéno-sensibles.***

La grande majorité des modèles cellulaires utilisés pour étudier la signalisation androgénique sont dérivés de tumeurs. Ce sont entre autre, des lignées tumorales prostatiques qui possèdent un récepteur des androgènes endogène telles que les cellules humaines LNCaP dérivées d'une métastase au niveau d'un ganglion lymphatique ou les cellules du modèle de tumeur prostatique en xénogreffe CWR22R. Au contraire, d'autres lignées n'expriment pas le récepteur des androgènes : ce sont les cellules PC3 et DU145 dérivées de métastases au niveau des os et du cerveau respectivement. Une autre alternative est l'utilisation de cellules d'origine non-prostatiques telles que des cellules dérivées de rein CV1 ou COS-7 ou encore les fibroblastes NIH-3T3. L'inconvénient de ces lignées tumorales est qu'elles diffèrent toutes par des dérégulations de leur voies de signalisation (par exemples, perte d'expression de AR, voie PI3K suractivée par inactivation de PTEN, expression constitutive de ras, associées ou non à des mutations de gènes plus ou moins identifiées). Bien que les comparaisons puissent être enrichissantes, l'étude de la signalisation androgénique d'un récepteur surexprimé après transfection d'un vecteur d'expression de AR dans ces lignées pose certains problèmes. Les données obtenues sont divergentes d'une lignée à l'autre et peuvent être difficilement interprétables. Ces lignées caractérisent davantage les processus de la progression tumorale et ne permettent pas de comprendre les dérégulations qui sont mises en cause dans le déclenchement de la tumeur.

Le laboratoire a développé des outils pour étudier les modulations de la signalisation androgénique au cours des processus normaux de prolifération et de différenciation et identifier des causes de dérégulation qui peuvent aboutir au développement tumoral.

Une lignée de cellules épithéliales sensibles aux androgènes a ainsi été obtenue à partir de cultures primaires de canaux déférents de souris prépubères : la lignée VDEC, *Vas Deferens Epithelial Cells* (Manin et al., 1992) (**figure n°42**). Ces cellules, immortalisées de façon spontanée, sont capables de proliférer puis de se différencier lorsqu'elles sont ensemencées

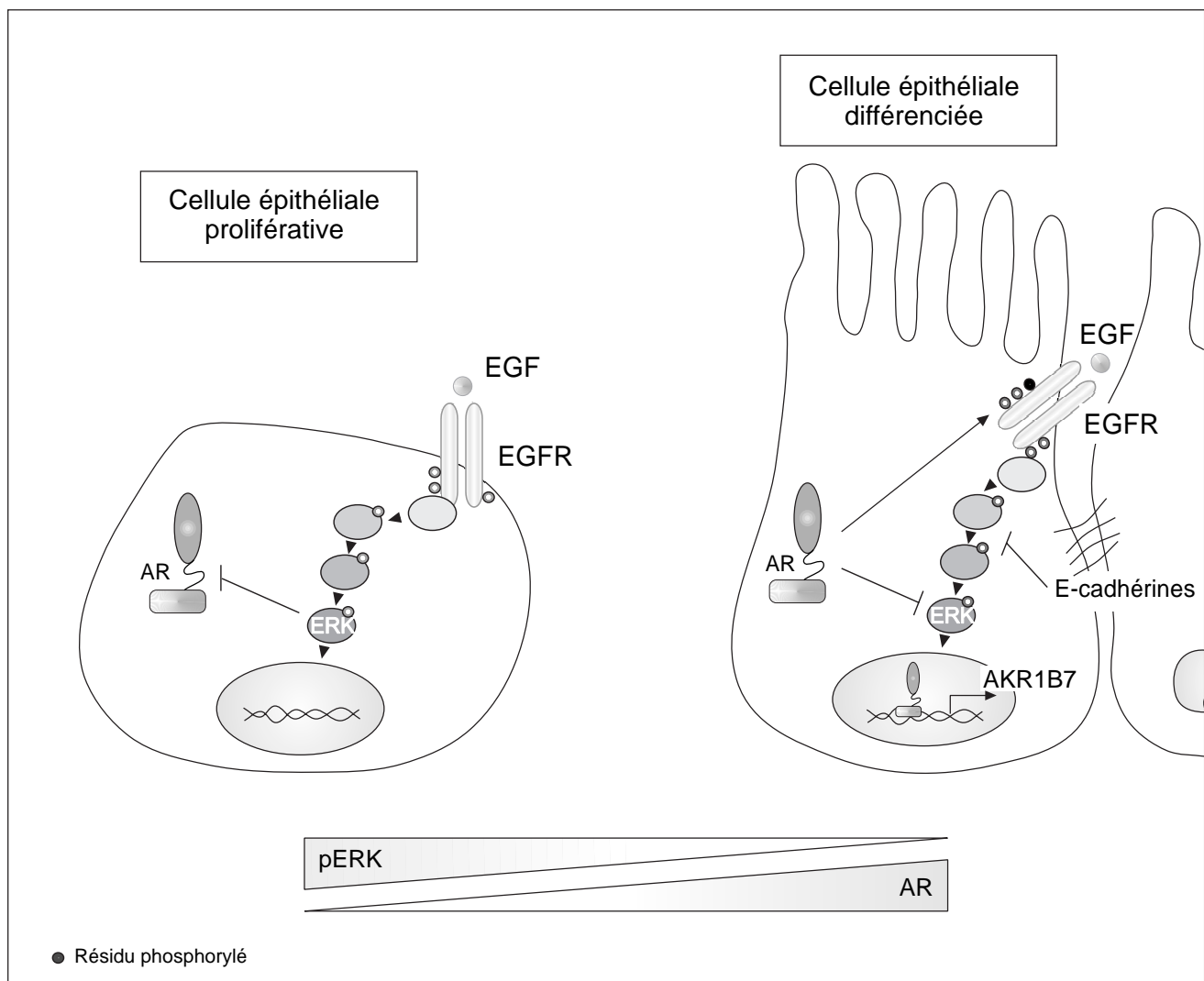


sur un support microporeux qui permet l'accès des facteurs du milieu aux membranes basolatérales. Après ensemencement à confluence, une polarisation homogène de la monocouche est observable, en microscope inversé, au bout de 72h par un changement de conformation des cellules. Ces cellules, cultivées dans un milieu défini sans sérum, expriment des marqueurs de différenciation comme le gène *akr1b7* en réponse aux androgènes. La différenciation des cellules est associée à leur polarisation avec la mise en place de microvillosités apicales et de jonctions serrées (zonula occludens et desmosomes, *figure n°42*).

Dans une étude préliminaire, j'ai analysé la signalisation androgénique au cours de la différenciation des cellules VDEC en ciblant les relations qui existent entre AR et certains régulateurs du cycle cellulaire. Ce travail nous a permis de montrer que les androgènes ne jouent pas un rôle majeur dans la prolifération ou dans l'arrêt du cycle cellulaire associé à la différenciation des cellules. Les androgènes ne modifient pas le pourcentage de cellules en phase S au cours de la prolifération; ils n'influencent pas les variations des profils d'expression des régulateurs du cycle cellulaire, qui dépendent de l'établissement des contacts entre les cellules: phénomène connu sous le nom « *d'inhibition de contact de la prolifération cellulaire* ».

Nous avons également montré que dans ce modèle, le récepteur des androgènes, peu exprimé pendant la prolifération, voit son expression fortement accrue après polarisation des cellules en particulier en réponse aux androgènes, ce qui active la transcription de gènes cibles comme le gène codant pour l'aldose réductase AKR1B7. Ainsi se met en place une sensibilité accrue des cellules aux androgènes au cours de la différenciation cellulaire. L'accroissement des taux de AR est dû à la fois à : i) une augmentation de la transcription du gène indépendante des androgènes (augmentation du taux de messagers dans les cellules polarisées en l'absence d'androgènes) ii) des modifications post-traductionnelles avec une activation de la boucle d'autorégulation qui permet, en réponse aux androgènes, la mobilisation des messagers de AR vers les poly-ribosomes, leur traduction puis la stabilisation du récepteur néoformé.

Dans ces cellules épithéliales, nous avons montré que l'expression et l'activité de AR dépendent d'interactions avec les voies de signalisation intracellulaires et notamment la voie des MAPK activée par le facteur de croissance EGF. En effet, dans des conditions de faible densité cellulaire, mais qui permettent la polarisation des cellules, l'addition d'EGF ré-active le cycle cellulaire en association à une perte d'expression de AR. Cet effet est opéré via les



**Figure n°43: Connexions entre les voies de signalisation des androgènes et celles du facteur de croissance EGF.**

Les cellules épithéliales de canal déférent en culture expriment peu le récepteur des androgènes lorsqu'elles sont en phase de prolifération. Par contre, dans les cellules épithéliales en voie de différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'établissement des jonctions cellulaires via les E-Cadhérines, s'accompagne d'une augmentation de l'expression du récepteur des androgènes associée à l'activation de la transcription de ses gènes cibles comme *akr1b7*. Cet accroissement de la sensibilité aux androgènes est en partie dépendant de l'inhibition de la voie EGF-MAPK. En effet, dans des cellules différenciées et polarisées à faible densité dans un milieu dépourvu d'EGF, l'addition d'EGF provoque une réentrée des cellules dans le cycle cellulaire, avec activation de la voie MAPK et une diminution parallèle de l'expression de AR qui peut être empêchée par un inhibiteur de la voie MAPK. La répression de la voie MAPK dans les cellules différenciées est renforcée par la présence des androgènes alors que, paradoxalement, les androgènes stimulent la phosphorylation de EGFR (tyrosines 1068 et 1173). Tout se passe comme si les androgènes induisaient un découplage de la voie EGFR-MAPK. Les mécanismes de ce découplage restent à élucider.

AR, androgen receptor; EGF, epidermal growth factor; EGFR, EGF receptor.

MAPKs puisque l'inhibition de cette voie empêche la chute du taux de AR en réponse à l'EGF.

Si les androgènes ne jouent pas un rôle majeur dans l'arrêt du cycle cellulaire, ils interviennent dans le maintien des fonctions différenciées, notamment en contrôlant le niveau d'activité de la voie MAPK ; le niveau de phosphorylation des ERKs étant toujours plus faibles en présence de DHT. De façon surprenante, la DHT provoque une phosphorylation du récepteur EGFR mais qui n'aboutit pas à l'activation de la voie MAPK (pas de phosphorylation des substrats ERKs). Il y a donc un découplage par les androgènes de la voie EGFR-MAPK. La phosphorylation de EGFR implique le récepteur AR puisqu'elle est bloquée en présence d'un anti-androgène comme le bicalutamide ou par transfection des cellules avec des ARN interférents dirigés contre AR. En revanche, ces mêmes traitements ne modifient pas de façon significative la phosphorylation des ERKs. Ceci suggère que la voie MAPK est inhibée par des effets indirects de AR via le croisement avec d'autres voies de signalisation ou bien par des effets non génomiques n'impliquant pas AR (*figure n°43*).

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une publication actuellement en révision et présentée en annexes. D'autre part, des travaux sont en cours pour essayer de démontrer les mécanismes de contrôle de la voie EGFR-MAPK par les androgènes.

La présentation des résultats se focalisera sur l'identification d'un nouveau co-régulateur de AR qui affecte la signalisation androgénique et dont la dérégulation pourrait être un facteur lié au développement tumoral: **la nucléophosmine B23.1/NPM**.

Les résultats qui suivent sont présentés sous forme de deux articles soumis aux éditeurs, auxquels sont associés quelques résultats complémentaires :

- Le premier article décrit la méthodologie utilisée pour identifier la nucléophosmine/B23.1 (*NPM*) comme un nouveau partenaire d'interaction du récepteur des androgènes, la relation étroite qui existe entre les profils d'expression et de localisation de ces deux protéines dans les tissus androgéno-sensibles, leur capacité à interagir *in-vivo* et une caractérisation de la nucléophosmine dans chacun des états de prolifération et de différenciation.
- Le deuxième article analyse l'implication de la nucléophosmine dans la tumorigenèse prostatique en corrélant sa capacité à réguler positivement l'activité du récepteur des





androgènes dans des cellules tumorales de la prostate et une dérégulation de son niveau d'accumulation dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain.

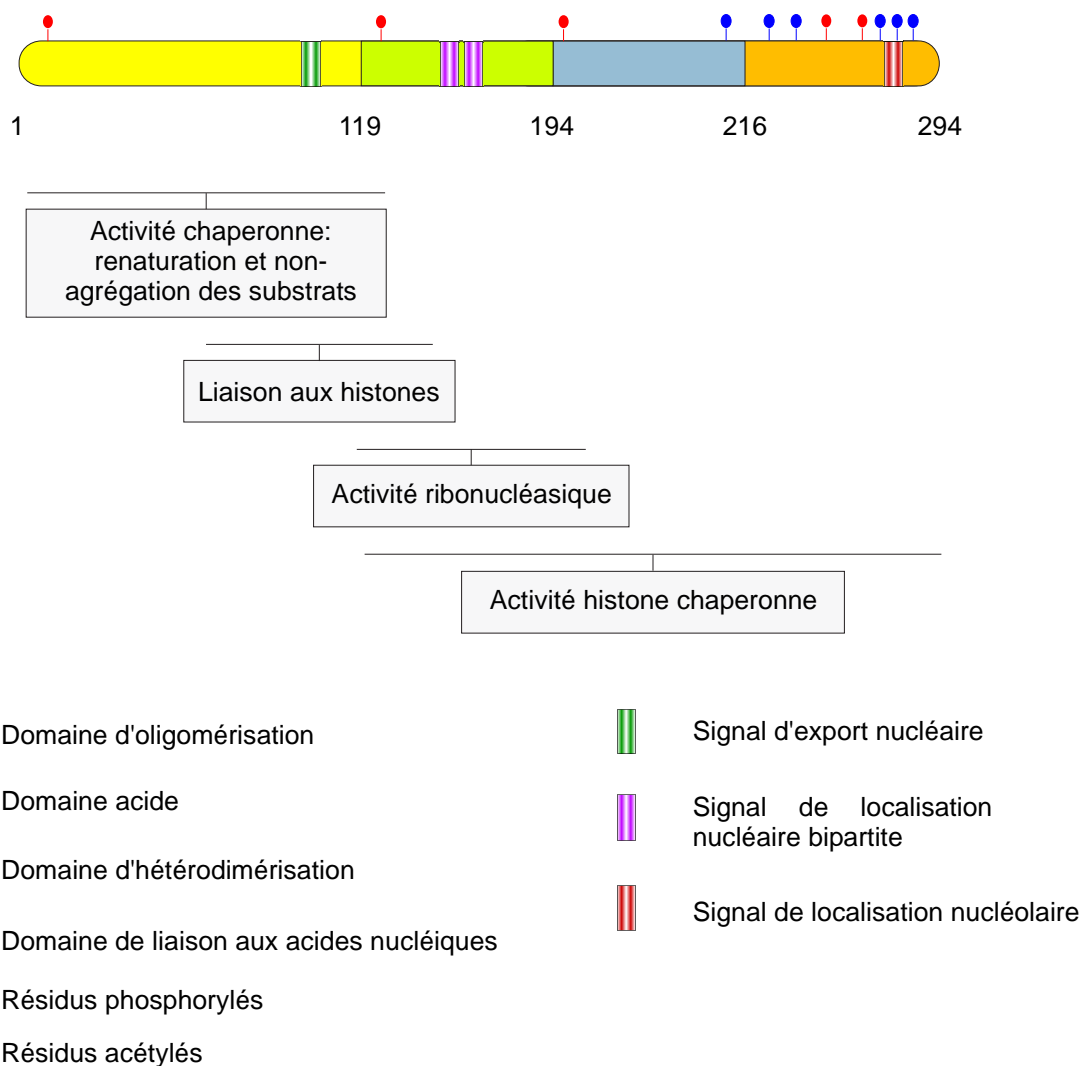
- Les résultats complémentaires portent sur la régulation de l'activité d'autres récepteurs nucléaires par la nucléophosmine.



\*\*\*\*\*

## ***Résultats***

\*\*\*\*\*



Résidus	Protéines effectrices	Effets sur l'activité de NPM
Sérine 4	Plk1	Participation à la duplication des centrosomes
Sérine 125	CK2	Détachement du substrat, stabilité de NPM
Thréonine 199	CDK2/cycline E	Dissociation de NPM et des centrosomes
Thréonines 234-237	cdc2/cycline B	Ré-adressage de NPM vers les centrosomes
Lysines 212-232-250-257-292	p300	Remodelage de la chromatine par liaison aux histones acétylées et initiation de la transcription

#### Figure n°44: Structure et activités de la nucléophosmine.

Le domaine d'holigomérisation amino-terminal de la nucléophosmine est impliqué dans la formation d'hexamères et porte l'activité chaperonne qui facilite la renaturation des protéines et empêche leur agrégation. Par son domaine d'hétérodimérisation, la nucléophosmine se lie à l'isoforme minoritaire B23.2 issue d'un épissage alternatif. On remarque que le domaine de liaison aux histones et celui qui porte l'activité d'histones chaperonne ne se recoupent que partiellement. La nucléophosmine présente une affinité pour les acides nucléiques par son domaine carboxy-terminal et possède une activité ribonucléasique qui intervient dans la maturation des ARNs ribosomiaux. La phosphorylation ou l'acétylation de plusieurs résidus de NPM sont importants pour la régulation de ses diverses activités. Plk1, Polo-like kinase 1; CK2, Caseine kinase 2; CDK2, cyclin dependant kinase 2; cdc2, cell division control 2.

## **I. Identification de la nucléophosmine/B23.1 comme un nouveau partenaire du récepteur des androgènes.**

Les androgènes jouent un rôle central dans les processus physiologiques de développement, de survie et de maturation des épithélia génitaux. Leurs effets sont relayés par le récepteur des androgènes (AR) dont l'activité est largement modulée par son interaction avec des protéines co-régulatrices. Dans l'objectif de mieux comprendre comment s'opère le contrôle de AR par ses partenaires d'interaction dans un contexte physiologique de prolifération et de différenciation, nous avons réalisé un crible d'interaction différentielle combiné à une analyse protéomique. Nous avons débuté l'isolement de co-facteurs de AR à partir d'extraits nucléaires de cellules épithéliales prolifératives ou différenciées, cultivées en présence d'androgènes. Ces extraits ont été soumis à une chromatographie d'affinité impliquant le domaine C-terminal du récepteur des androgènes fusionné à la GST (gluthation S-transférase). Les complexes formés et fixés aux billes glutathion-sépharose ont été lavés et séparés en électrophorèse bi-dimensionnelle. Les protéines qui présentaient un marquage différentiel entre les deux conditions de culture ont été excisées et séquencées. Cette démarche a permis d'identifier un nouveau partenaire du récepteur des androgènes : la nucléophosmine/B23.1 (NPM).

NPM est une phosphoprotéine de 294 acides aminés chez l'homme et de 37 kDa, majoritairement nucléolaire et associée à de nombreux processus cellulaires (*figure n°44*). La localisation de NPM, son abondance et ses activités suggèrent qu'elle joue un rôle clef dans la maturation et le transport des ribosomes mais aussi dans l'élaboration des ARN ribosomaux. En effet, la nucléophosmine présente la capacité de se lier aux particules ribonucléoprotéiques préribosomales, possède une activité ribonucléasique pour le clivage des pré-ARNr (Herrera et al., 1995; Savkur and Olson, 1998) (Schmidt-Zachmann et al., 1987) et migre massivement dans l'ensemble du noyau en réponse à des drogues qui inhibent la synthèse ribosomale (Yung et al., 1985). La nucléophosmine participe aussi à la réplication de l'ADN en stimulant l'activité de l'ADN polymérase alpha (Umekawa et al., 2001), se lie aux acides nucléiques et ribonucléiques (Dumbar et al., 1989; Wang et al., 1994) et représente un facteur critique pour la duplication des centrosomes (Okuda et al., 2000; Tokuyama et al., 2001). Une autre fonction majeure de la nucléophosmine est son activité chaperonne. En effet NPM prévient l'agrégation des protéines (Szebeni and Olson, 1999), stimule l'import de protéines possédant un signal de localisation nucléaire dans le noyau (Szebeni et al., 1995) et possède aussi une activité de



chaperonne d'histones. En effet, la nucléophosmine se lie aux histones, participe à la formation des nucléosomes et possède la capacité de décondenser la chromatine (Okuwaki et al., 2001). Cette activité d'histone chaperonne est dépendante de son acétylation par p300 et régule positivement la transcription en modulant la structure nucléosomale lorsque les histones sont acétylées (Swaminathan et al., 2005). NPM régule aussi l'activité de plusieurs facteurs de transcription par son interaction directe : elle réprime l'activité de Yin Yang 1 (YY1) et de IRF1 (interferon regulatory factor-1) (Inouye and Seto, 1994; Kondo et al., 1997), active celle de NF- $\kappa$ B (Dhar et al., 2004) et contrôle différenciellement, selon les études, la capacité de p53 à activer ses gènes cibles (Colombo et al., 2002; Maiguel et al., 2004). Enfin, une autre activité majeure de la nucléophosmine réside dans son rôle de protection des cellules contre l'apoptose (Chou and Yung, 2001; Wu et al., 2002; Ye, 2005). Il faut aussi noter l'existence de l'isoforme minoritaire B23.2 issue d'un épissage alternatif et qui correspond aux 255 premiers acides aminés de B23.1 additionnés de deux acides aminés distincts sur l'extrémité carboxy-terminale (Chang and Olson, 1989).

Les résultats rapportés dans cette première publication présentent tout d'abord une forte correspondance des profils d'accumulation de AR et de NPM au niveau de différents tissus murins avec une forte accumulation dans les tissus androgéno-dépendants. Des expériences d'himmuno-histochimie réalisées sur des coupes de prostate, d'épididyme et de canal déférent révèlent un marquage principalement nucléolaire de NPM et nucléaire de AR pour les cellules épithéliales. Dans des cellules épithéliales de canal déférent en culture (VDEC), la nucléophosmine est plus fortement exprimée dans les cellules en prolifération par rapport aux cellules différenciées. Cette différence s'explique par une forte diminution de NPM au niveau de la fraction poly-ribosomale et cytoplasmique dans les cellules différenciées. Un test d'interaction par chromatographie d'affinité impliquant le récepteur pleine longueur fusionné à la GST, indique que NPM interagit préférentiellement avec AR lorsque les extraits ont été préparés à partir de cellules prolifératives. Cette observation confirme l'identification de NPM dans la condition proliférative au cours de notre crible différentiel de départ. Enfin, les deux protéines interagissent *in-vivo* dans des cellules prostatiques PC3 dans lesquelles a été introduit le récepteur des androgènes, et semblent co-localisées dans ces mêmes cellules au niveau de la fraction nucléaire.

Ainsi, la représentation tissulaire de la nucléophosmine et son interaction avec le récepteur des androgènes, suggèrent qu'elle pourrait participer au maintien de l'homéostasie des tissus androgéno-dépendants.





# Identification of Nucleophosmin/B23 as an Androgen Receptor Interacting Protein Differentially Expressed during Cell Proliferation and Differentiation.

Laurent Léotoing<sup>1</sup>, Michèle Manin<sup>1</sup>, Anne Cayre<sup>2</sup>, Frédérique Penault-Llorca<sup>2</sup>, Christophe Chambon<sup>3</sup>, Georges Veyssière<sup>1</sup>, Laurent Morel<sup>1,4</sup> and Claude Beaudoin<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>UMR 6547-CNRS, Université Blaise Pascal Clermont II, Campus Universitaire des Cézeaux 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.

<sup>2</sup>Service de Pathologie, Centre Jean Perrin, 58 Rue Montalembert, BP 392, 63011, Clermont-Ferrand Cedex 1, France.

<sup>3</sup>Plateforme Protéomique, INRA, 63122 St-Genès-Champanelle, France.

<sup>4</sup>Correspondence to: Laurent Morel, UMR 6547-CNRS, Equipe Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire; 24, Avenue des Landais; 63177 Aubière Cedex, France

Tel : (+33) 04 73 40 77 56

Fax : (+33) 04 73 40 70 42

E-mail address : [Laurent.Morel@univ-bpclermont.fr](mailto:Laurent.Morel@univ-bpclermont.fr)

**Running head:** NPM interaction with AR.

**Keywords:** androgens, androgen receptor, nucleophosmin, growth and differentiation

**Figures:** 5

## ABSTRACT

The androgen receptor (AR) functions as a ligand-activated transcription factor that stimulates growth, differentiation and survival of epithelial cells in androgen-responsive tissues. Although numerous regulatory proteins have been shown to interact with AR to regulate transcription of target genes, little is known about the protein complexes associated with AR during development and functional maturation of male genital tract epithelia. To help fill this gap, we have identified nucleophosmin (NPM) as a novel AR-associated protein using a proteomic approach. Here, we show that NPM, a multifunctional protein involved in ribosome synthesis, development and cancer pathogenesis, is coexpressed with AR in multiple male reproductive organs. NPM exhibits a robust nucleolar staining while AR is localized in the nuclear compartment in the epithelial layers of the prostate, epididymis and *vas deferens*. In the testis, NPM was detected in most cell types while AR is restricted in the nuclei of Sertoli, Leydig and peritubular myeloid cells. We report that NPM is strongly expressed in proliferating *vas deferens* epithelial cells but was found decreased following differentiation although it is still largely accumulated within the nuclei with AR. Molecular studies showed that NPM is a component of AR complexes and that their interaction decreased after cell differentiation. Altogether, these findings show that NPM is a novel AR interacting protein and that changes in the NPM expression levels during differentiation could be related to the regulation of AR that has critically important physiological roles in epithelial cell proliferation and differentiation.

## INTRODUCTION

Androgens play critical roles in the regulation of cell growth, differentiation and survival in the male reproductive system including prostate and Wolffian-derived sex accessory organs (*vas deferens*, epididymis and seminal vesicles). The major physiological androgen testosterone (T) and its more active metabolite 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) are especially known to be essential for the functional maturation of epithelial cells in the male genital tract at puberty as well as for their maintenance during adulthood (reviewed in (Cunha et al., 1992; Cunha et al., 1987; Mooradian et al., 1987)). The biological actions of androgens are mediated through the androgen receptor (AR), a ligand-activated transcription factor which belongs to the steroid and

nuclear hormone receptor superfamily (Laudet et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1995). Upon hormone binding, AR have been shown to elicit its effects via either non-genomic activation of the phosphoinositide-3 (PI-3) kinase/Akt and/or mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (Baron et al., 2004; Peterziel et al., 1999; Sun et al., 2003) or, classical genomic mechanisms that regulate the transcription of specific target genes through binding to DNA response elements referred to as androgen response elements (AREs) located within promoter or enhancer regions (Claessens et al., 2001; Langley et al., 1995; Roche et al., 1992).

With regards to the latter case, hormone binding causes conformational changes that result in receptor dissociation from an HSP90 chaperone complex, homodimerization and the generation of



interacting sites which target AR to modulation by a large number of co-regulatory proteins considered to play diverse roles including histone modification, chromatin remodelling, and transcriptional regulation to signal transduction initiated by growth factors and cytokines. Thus chromatin remodelling activities recruited by AR may alter chromatin structure and allow other essential transcription factors to bind and activate or repress transcription. During the past several years, cloning methods based on protein-protein interactions in the absence or presence of ligand identified a number of AR coactivators and corepressors (Heinlein and Chang, 2002). Several known AR coactivators such as the member of the p160 family (SRC1, SRC2/TIF2/GRIP1, and SRC3/RAC3/AIB1) play pivotal roles in AR activation since they permit the recruitment of the histone acetyltransferase (HATs) CBP/p300 and p/CAF (Demarest et al., 2002; Xu and Li, 2003). Conversely, corepressors like SMRT and N-CoR can attenuate AR-dependent transcription by recruiting histone deacetylases (HDACs) such as HDAC1 and HDAC2 in a repressive complex (Cheng et al., 2002; Hodgson et al., 2005; Kang et al., 2004). Identification of AR-associated proteins have provided important insights for understanding the AR co-regulator network and its regulation. However, it has become clear now that coactivator complexes are differentially utilized in both a cell- and promoter-specific fashion to activate or repress androgen-dependent gene transcription.

We have previously demonstrated, using a mouse *vas deferens* epithelial cell line (VDEC), that AR dependent gene transcription was activated when cells entered their differentiation program whereas MAPK signaling was inhibited over the same time period (Leotoing et al., 2006; Manin et al., 2000; Manin et al., 1992). This suggests that changes in AR activity during differentiation might be related to changes in expression and composition of AR coregulatory components, themselves targets of intracellular signaling pathways. As a first step in the search for interactors that may control AR functions during *vas deferens* epithelial cell proliferation and differentiation, we used a proteomic approach coupled to mass spectrometry. In this report, we describe the identification of nucleophosmin (NPM) as a androgen receptor interacting protein. We found that NPM is highly expressed in testis, prostate, brain and adipose tissues and moderately in other male reproductive tissues such as epididymis and *vas deferens*. Further analysis show that NPM protein immunoprecipitates with AR in a ligand-independent fashion and that this interaction is differentially regulated during proliferation and differentiation of epithelial cells. Therefore, we propose that NPM may act as an AR coregulatory protein *in vivo* and play an important role in male reproductive tissues by coordinating a subset of AR functions essential for supporting epithelial cell growth and differentiation in response to androgens.

## RESULTS

### Identification of AR interacting proteins by 2D-electrophoresis.

In our first approach to purify proteins that bind AR to regulate its functions during *vas deferens* epithelial cell proliferation and differentiation, we used the carboxy-terminal domain of the receptor fused to the glutathione S-transferase (GST-AR<sub>E/F</sub>) as a bait. As the majority of the AR interacting proteins function in the nucleus, although some of them are localized in the cytoplasm where they may receive regulation signals from signal transduction cascade, we decided to prepare nuclear extracts from growing or differentiated DHT-treated VDEC and to load them onto glutathione-Sepharose 4B beads coated with the GST-AR<sub>E/F</sub> fusion protein. Then, the bound proteins were eluted and separated by two-dimensional (2D) electrophoresis as summarized in Figure 1a. Numerous proteins spots, including the GST fusion protein, were apparent on silver-stained 2D gels (Figure 1b) and a nuclear protein of apparent MW of 37 kDa and and pI of 5, appeared to bind differentially to the carboxy-terminal domain of AR. This band was excised and subjected to MALDI time-of-flight (MS) analysis. Five peptides were identified that all matched NPM (Figure 1c), an abundant nucleolar shuttling protein known to modulate diverse molecular functions among which are ribosome biogenesis, cell proliferation and survival after DNA damage (reviewed in (Grisendi et al., 2006)).

### NPM expression in mouse reproductive tissues.

To gain some insight into relative expression levels of NPM in mouse reproductive organs, extracts were prepared from male androgen target tissues taken from 20-wk old wild-type mice and assayed by western immunoblotting (Figure 2). NPM was detected in all male reproductive tissues examined, although the relative level of NPM protein in seminal vesicles appears to be much less than in the other organs. Interestingly, NPM is highly expressed with AR in testis and prostate and moderately in other male reproductive organs such as epididymis and *vas deferens* suggesting a potential relationship between NPM and AR. However, it must be taken into account that in some tissues like the *vas deferens*, the proportion of epithelia compared to stroma is much less important than epididymis and prostate. Because NPM is a component of AR complex and male reproductive organs are all androgen target tissues, expression patterns of AR and NPM were compared by immunohistochemical staining (Figure 3). Specific NPM immunostaining was detected in most cell types of the testis while AR staining localizes to the nuclei of Sertoli, Leydig and peritubular myeloid cells as previously described (Vernberger et al., 1994). A similar histological analysis was performed with prostate, epididymis and *vas deferens* and as reported, AR was found most exclusively in the nuclei of



epithelial cells with a strong additional staining in the stromal elements of the *vas deferens*. As seen in Figure 3, NPM was predominantly expressed in the luminal epithelial layers and was enriched in the nucleoli. These informations indicate that NPM is highly expressed in the male reproductive tissues and suggest that AR and NPM might interact in AR-positive, AR-dependent epithelial cells, an issue that will be addressed further below.

#### **NPM levels and subcellular distribution during cell proliferation and differentiation.**

As testis, epididymis, *vas deferens* and prostate express relatively high levels of NPM and are known to be androgen responsive tissues, we determine whether NPM levels might be affected by androgens using the mouse *vas deferens* epithelial cell line (Manin et al., 2000; Manin et al., 1992). Moreover, since NPM is known to be enriched in proliferating cells, this cell line might also be a valuable tool for studies of NPM expression throughout the differentiation process. Total cellular lysates from control untreated or DHT-stimulated VDEC cells were separated by 10% SDS-PAGE and subsequently analyzed by Western blot immunoassay. The results show that there was a marked decrease in the level of total cellular NPM protein during epithelial cell differentiation (Figure 4a). However, NPM protein levels did not change after 48h of 10 nM DHT treatment, indicating thus that NPM is not androgen responsive in this cell line. In addition, there was also a decrease in the steady-state level of NPM mRNA to less than 30% following cell differentiation suggesting that NPM mRNA expression could be transcriptionally down-regulated following differentiation as already observed during RA-induced differentiation of HL-60 cells (Hsu and Yung, 1998).

Earlier studies have shown that NPM resides primarily within the nucleolus, where it can be readily detected in VDEC by immunofluorescence performed with the antibody directed to the C-terminus of wild-type NPM (Figure 4b). In addition, the results showed that NPM protein is also accumulated with AR in the nucleoplasm of VDEC maintained in proliferation and that epithelial cell differentiation led to a net relocalization of endogenous NPM to the nucleoli. To determine how cell proliferation and differentiation influence the subcellular distribution of NPM, we prepared cytosolic, nuclear and polyribosomal extracts from VDEC.

In growing epithelial cells, the NPM concentration was greatest in the polyribosomal compartment than in the cytosol and the nuclei (Figure 4c.). NPM accumulation was greatly decreased in the polyribosomal and cytosolic compartments during cell differentiation. In contrast, the level of NPM in the nuclei was not affected and remained high with AR. Of interest, androgens did not change the relative levels of NPM in these compartments (not shown)

although AKR1B7 strongly accumulated in the cytoplasm in response to DHT as previously reported (Manin et al., 2002). These data indicate that cellular differentiation influence the shuttling of NPM between subcellular compartments and suggest that this mechanism could be involved in regulating the actions of AR.

#### **NPM is an AR-interacting protein in vitro and in vivo.**

To corroborate our finding that AR and NPM reside within the same protein complex, we next wanted to verify the AR-NPM interaction *in vitro*. We therefore performed GST pull-down experiments with nuclear extracts prepared from proliferative and differentiated DHT-treated VDEC using the GST-fusion of full length AR. As shown in Figure 4d, comparable amounts of NPM protein were detected in both inputs however, the results clearly show that NPM was complexed more strongly with the affinity purified GST-AR<sub>1-919</sub> when cells were maintained in a proliferative state. To confirm the interaction between NPM and AR *in vivo*, we tagged NPM with a HA epitope and expressed the tagged protein together with AR in PC3 cells. Both AR and HA-NPM proteins were detected in the nuclei of co-transfected cells but NPM overexpression led to a net increase in the staining within the nucleolus (Figure 5A). Whole cell lysates from PC3 cells transfected with AR alone were then immunoprecipitated with normal rabbit IgG or an anti-NPM polyclonal antibody. As shown in Figure 5b, the AR protein was detected only in immunoprecipitates in which the anti-NPM antibody was used, confirming that the AR protein forms a protein complex with NPM regardless of the absence or the presence of androgens. Taken together with the data of Figure 4, these findings indicate that NPM preferentially interact with AR in proliferating cells rather than in resting cells however, it remains unclear whether interaction of NPM with AR take place within the nucleoplasm or the nucleolar compartment.

#### **DISCUSSION**

The mechanisms by which androgens support male reproductive functions are not fully understood despite the well established fact that they serve critical roles in differentiation, maturation and proper functioning of the male reproductive system. The androgen receptor (AR) mediates the effects of androgens and like other nuclear hormone receptors, functional activities of the AR can be modulated through interactions with various co-regulators (Rosenfeld and Glass, 2001). In the present report, we describe the isolation of nucleophosmin (NPM) as a novel AR-associated protein. Immunoblotting analyses have revealed that NPM is co-expressed in many male reproductive organs as well as in the brain and the adipose tissue. In addition, NPM is highly



abundant in the *vas deferens* epithelial cell line maintained in proliferation, is present at a much lower levels after differentiation where it preferentially accumulates in the nucleoli and is found associated with AR in living cells. In light of these results, it is conceivable that NPM might play crucial roles in the regulation of AR functions during epithelial cell proliferation and differentiation.

NPM is an essential shuttling protein that has been implicated in a wide range of cellular processes including regulation of cell proliferation (Yun et al., 2003), gene expression (Dhar et al., 2004; Weng and Yung, 2005), organogenesis and embryonic development (Grisendi et al., 2005). Additional properties of NPM also include acting as a molecular chaperone (Okuwaki et al., 2001), nuclear import (Szebeni et al., 1995) and regulation of apoptosis (Ahn et al., 2005; Ye, 2005). Moreover, NPM has been described to be significantly abundant in tumor and growing cells compared to normal resting cells (Feuerstein et al., 1988; Hsu and Yung, 1998). Therefore our findings that the high expression levels of NPM in cells maintained in proliferation is decreased following cell differentiation and specifically accumulated in the nuclei with AR remain consistent with a potential role of NPM in regulating a subset of AR functions during cell growth and differentiation.

NPM was first implicated in ribosomal RNA (rRNA) synthesis and ribosome biogenesis (Okuwaki et al., 2002; Savkur and Olson, 1998). It has been ascribed a role in proliferation due to its rapid increase in synthesis during mitogenic stimulation (Feuerstein and Mond, 1987). It is interesting to speculate as to the role of NPM binding to AR since the expression and phosphorylation levels of NPM, which correlates with cellular proliferative capacities, are both enhanced by androgens in the prostate (Tawfic et al., 1993). With regard to a role in ribosome biogenesis, earlier studies have shown that synthesis of ribosomes, especially their assembly into polysomes, markedly declined after androgen deprivation (Mainwaring and Derry, 1983; Mainwaring and Wilce, 1973). In addition, prostatic ribosomes from animals treated with 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone support a significantly higher incorporation of radiolabeled amino acids into proteins than do ribosomes isolated from castrated animal controls (Mainwaring and Derry, 1983). How androgens participate in rRNA synthesis, ribosome biogenesis and polysomes assembly is not yet fully understood however, one hypothesis is that the interaction describe herein between AR and NPM may be important for the production of new ribosomes as a prerequisite for sustained androgen-dependent cell growth.

NPM binds to several cellular and viral proteins including the HIV type 1 human Rev and Tat proteins (Fankhauser et al., 1991), hepatitis virus  $\delta$  antigen (Huang et al., 2001), the transcription factor YY1 (Inouye and Seto, 1994) and more recently, it has been

shown to interact with the tumor suppressor proteins p53, Rb and p19<sup>ARF</sup> (Bertwistle et al., 2004; Colombo et al., 2002; Takemura et al., 1999). Recent evidences demonstrate that NPM is involved in the regulation of p53 stabilization and activity however, the mechanisms through which NPM exert this function are not fully elucidated. NPM has both chaperone and nucleus-cytoplasm shuttling properties, through which it is thought to prevent protein aggregation in the nucleus during ribosome assembly and to facilitate the transport of ribosomal proteins. In fact, as proposed for p53, NPM might function as a molecular chaperone for AR, preventing self-aggregation, helping AR complex formation, regulating its trafficking and localization. This activity might be explained by the ability of NPM to bind nuclear localization signal containing peptides and to stimulate import of proteins into the nucleus (Szebeni et al., 1995; Szebeni and Olson, 1999).

The hypothesis described above warrant further investigation, but we cannot overlook the possibility that NPM enhances AR-dependent transcription. For example, NPM is capable to bind to histones (Okuwaki et al., 2001), to activate transcription from a chromatin template (Swaminathan et al., 2005) and to participate to the regulation of transcription through its interaction with the YY1 transcription factor (Inouye and Seto, 1994; Weng and Yung, 2005). Recently, NPM was described as a novel chromatin-remodeling factor which ability to enhance chromatin transcription is dependent on acetylation. In fact, NPM was shown to be acetylated by the histone acetylase p300, resulting in an increased affinity toward acetylated histones (Swaminathan et al., 2005). Interestingly, ligand-induced AR activity is also enhance by p300 and mutation of the AR acetylation motif abrogates p300 and reduces DHT-stimulated activity revealing thus that acetylation is an essential step in ligand-dependent activation of AR (Fu et al., 2000). Together with our data showing that NPM is an AR-interacting protein expressed in male androgen target tissues, these findings suggest that NPM and p300 could be recruited with AR in a transcriptional regulatory complex in response to androgens. Therefore, a potential role for NPM in the regulation of AR transcriptional activity should also be explored.

In conclusion, this study provides the first global characterization of multiprotein complex associated with AR during epithelial cell proliferation and differentiation. We have identified NPM as a novel AR-interacting protein and evaluated its expression in male mouse reproductive tissues. The observation that both proteins are found co-expressed in numerous androgen target tissues and that NPM reduced levels were accumulating in the nucleus with AR following epithelial cell differentiation suggest that NPM may regulate a subset of AR functions and introduce the idea that NPM may also regulate the expression and activity of some steroid hormone nuclear receptors.





## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals, reagents and antibodies.

Invitrogen (Cergy Pontoise, France) supplied the Dulbecco's modified Eagle (DMEM)/Ham's F12 medium, glutamine, Hepes, transferrin, phosphate buffered saline (PBS), gentamycin and foetal calf serum (FCS). Bovine insulin, EGF, Cholera toxin, dibutyl cAMP, selenium, hydrocortisone, dihydrotestosterone (DHT) and matrigel were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Microporous PET membranes were from Becton Dickinson Labware (Ozyme, Saint-Quentin Yvelines, France). Rabbit polyclonal anti-AR (PG-21) antibody was purchased from Upstate Biotechnology (Euromedex, Mundolsheim, France) and anti-HA.11 from Covance (Eurogentec, Seraing, Belgium), goat polyclonal anti-NPM (C-19) antibody from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France), and anti- $\beta$ -actin (C-11) antibody was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### Cell culture conditions and transfections.

Mouse *vas deferens* epithelial cells (VDEC) were grown as previously described (Manin et al., 2002). Cells maintained in proliferation were seeded on serum fibronectin-coated plastic in basal medium supplemented with 1 ng/ml EGF. Differentiation of VDEC was allowed for 3 days after seeding onto matrigel-coated microporous membranes in 6-well plates at confluent density ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) in the same medium supplemented or not with dihydrotestosterone (DHT). Medium was changed every two days and experiments were repeated three times. PC3 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated foetal calf serum and cultured at 37°C in water-saturated 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.  $3 \times 10^5$  cells per well were plated in 6 well-plates and the next day, transient transfections were performed using the PEI Exgen 500 procedure (Euromedex, France).

### Plasmid constructs.

Expression vector pcDNA3.2 (Invitrogen) containing additional coding sequences for influenza hemmagglutinin (HA) (YPYDVDPYASL) and FLAG (DYKDDDK) epitopes was kindly provided by Dr. D. Monte (Institut de Biologie de Lille, France). The HA-tagged NPM expression vector was constructed by subcloning into *Hind*III and *Xba*I sites of pcDNA3.2 the full-length human NPM PCR amplified fragment of pGEMJH1-B23.1 obtained from Dr. M.O.J. Olson (University of Mississippi Medical Center, USA). The expression vectors containing the full-length hAR and its carboxy-terminal part fused in frame with the open reading frame of glutathione S-transferase (GST) have been already described elsewhere (Baron et al., 2004).

### Preparation of cytosol, nuclear and polysome extracts.

Mouse *Vas deferens* epithelial cells were harvested, washed in cold ice PBS buffer and homogenized in buffer A [50mM NaCl, 10mM Hepes (pH 8.0), 0.5M sucrose, 1mM EDTA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 0.2% Triton X-100, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml apoprotinin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin and 7mM mercaptoethanol]. The homogenate was incubated on ice for 2 min, passed through a 26-gauge needle with a seringue and then, centrifuged at 2,500 x g for 15 min at 4°C. The 2,500 x g pellets were washed in buffer B [50mM NaCl, 10mM HEPES (pH 8.0), 25% glycerol, 0.1mM EDTA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml apoprotinin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin and 7mM mercaptoethanol], resuspended in buffer C [0.42M NaCl, 10mM HEPES (pH 8.0), 25% glycerol, 0.1mM EDTA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml apoprotinin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin and 7mM mercaptoethanol], sonicated on ice, and then centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4°C and the supernatants (nuclear extracts) were frozen at -80°C. The 2,500 x g supernatants were centrifuged at 100,000 x g for 2h at 4°C, and the supernatants (cytosol extracts) were frozen at -80°C. The 100,000 x g pellets were resuspended in buffer C, incubated on ice for 1h, and centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C, and then the resultant supernatant (polysomal extracts) was frozen at -80°C. Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

### GST pull-down assay.

Fresh overnight culture of BL21 pLysS *E. coli* strain transformed with GST-fused constructs were diluted 1:10 in LB medium containing ampicillin (100  $\mu$ g/ml) and incubated (with shaking) for 3-5 h at 37°C. Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.1 mM and incubation was allowed to continue at 30°C for another 4h. Bacterial cultures were pelleted and resuspended in STE buffer [10mM Tris (pH 8.0), 150mM NaCl, 1mM EDTA] containing 10% sarcosyl (vol/vol) and 1mM PMSF. Cells were then lysed on ice by mild sonication, mixed with Triton X-100 to a final concentration of 1%, and centrifuged at 100,000 x g for 30 min at 4°C. The bacterial supernatant was rocked overnight at 4°C with glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia) and beads were washed three times with PBS. Nuclear extracts of VDEC maintained in proliferation or allowed to differentiate were incubated with the beads in 150  $\mu$ l binding buffer [20mM Hepes (pH 7.6), 75mM NaCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 2% BSA, 0.05% Triton X-100, 0.5mM DTT, 1mM PMSF] by rocking overnight at 4°C. The glutathione-Sepharose beads were then washed three times and the recovered proteins were fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and analyzed by immunoblotting.



### Two-dimensional (2D) gel electrophoresis and protein identification by MALDI-TOF.

For 2D separation of AR-associated proteins, nuclear extracts (5 mg) prepared from VDEC were precleared for 2 h with GST and glutathione beads, and then incubated overnight with immobilized GST-AR fusion proteins. The beads were then washed five times with 1% NP40, dried by aspiration and dissolved for 30 min at 50°C in 50 µl of sample buffer with urea, NP40, mercaptoethanol and carrier ampholytes (Ghadimi *et al.*, 2002). Then, beads were rehydrated twice with 75 µl of rehydration buffer incubated for 30 min at 50°C. The pooled supernatants were recovered and transferred by passive in-gel re-swelling on immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3-10, 18 cm long), and then focused on PROTEAN® IEF system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). After isoelectric focusing, the IGP strips were equilibrated and the second dimension was carried out by standard SDS-PAGE on 10% gels. The gels were silver stained according to the procedure of Shevchenko *et al.* (Shevchenko *et al.*, 1996) and protein of interest were punched out for in-gel digestion with trypsin (Promega, Madison, USA) for 16 h. Digest products were completely dehydrated in vacuum centrifuge and resuspended in formic acid (2% w/v), desalted using Zip Tips C18 (Millipore, Bedford, USA) and eluted in TFA/acetonitrile (2:1) for mass spectrometrical analysis. The mass spectra were recorded by using a time-of-flight delayed extraction MALDI mass spectrometer (Perseptive Biosystems, Framingham, USA). 50 mg/ml 2,5-dihydroxybenzoic acid in 0.3% aqueous TFA/acetonitrile (2:1) was used as matrix. The masses were compared with known trypsin digest databases (NCBI and Swiss-Prot) using MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) and Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/>) search engines.

### Western blotting.

Mouse tissues were harvested from 20-wk old animals and immediately homogenized in ice cold NaCl buffer [0.42M NaCl, 20mM Hepes (pH 8.0), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 25% glycerol, 0.1% NP40, 1mM PMSF, 1µg/ml apoprotinin, 1µg/ml leupeptin]. To make the whole-cell lysates, cells were washed with PBS and resuspended in ice cold NaCl buffer. After brief sonication on ice and clarification for 30 min at 15,000 x g, 40 µg of proteins were resolved through SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with milk buffer [5% milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20] for 1 h and incubated with the indicated primary antibody in milk buffer overnight at 4°C. The membranes were washed three times with TBS-Tween 20 and then incubated 90 min with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin G secondary antibody (P.A.R.I.S biotech, Compiègne, France), followed by enhanced chemiluminescence (Santa Cruz

Biotechnology) according to manufacturer's instruction.

### Immunoprecipitation.

Cells were harvested, washed in cold ice PBS buffer and lysed in IP buffer [0.15M NaCl, 0.1% Triton X-100, 5mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA]. Whole-cell lysates were first precleared with Protein G Sepharose beads for 1 h and then incubated with rabbit normal IgG and anti-NPM (C-19) antibodies conjugated overnight, then preequilibrated Protein G Sepharose beads was added and incubated 3h at 4°C. The beads were collected by centrifugation and washed three times with IP buffer. Proteins were eluted by boiling in sodium dodecyl sulfate-sample buffer, resolved on polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting.

### RNA isolation and Northern blot analyses.

Total RNA was isolated from VDEC using the RNeasy method according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Montreuil-sous-bois, France). Total RNA (30µg) was separated on 1% denaturing formaldehyde-agarose gel, transferred onto nylon membrane in 10x SSC and then immobilized under UV light. After prehybridization, the membrane was hybridized at 42°C in a solution containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 5x SSC, 1mM EDTA, 10µg/ml of denatured salmon sperm DNA, and <sup>32</sup>P-labelled human NPM probe. After washing at 65°C for 20 min in 0.2x SSC and 0.1% SDS as a final stringency, the membrane was exposed on Kodak x-ray film at -80°C. The membrane was then stripped and reprobed for β-actin.

### Immunohistochemistry.

Mouse tissues (20-wk old) were collected on ice, fixed in ethanol/formaldehyde/acetic acid (75:20:5) for 24h at room temperature, embedded in paraffin and treated for AR and NPM expression determination. Sections were deparaffined with xylene, rehydrated with graded alcohol and distilled water, and washed in PBS. Non-specific binding sites were blocked using the avidin/biotin kit for 30 min and then washed. Slides were incubated overnight at 4°C with the anti-AR or anti-NPM antibodies (1µg/ml). After washing, endogenous peroxidase activity was quenched with 0.3% of hydrogen peroxide for 10 min and then washed in PBS. Revelation was realized using the Vectastain ABC streptavidin-peroxidase kit, which reacts with the diaminobenzidine substrate to give staining. Slides were contrasted using hematoxylin, dehydrated and mounted using the Vectastain mounting medium, and analyzed through a light microscope (Olympus BH2).

### Immunofluorescence analysis.

All the following steps were separated by two PBS washes at room temperature. Cells were fixed in



cold 4% paraformaldehyde-PBS, neutralized in 50mM NH<sub>4</sub>Cl-PBS and permeabilized with 0,25% Triton X-100-PBS. The rabbit polyclonal anti-AR, anti-HA and anti-NPM antibodies, were applied at 1:100 dilution overnight at 4°C. Preparations were washed three times in blocking buffer (5% goat serum in PBS) and incubated at 1:200 dilution respectively with goat anti-rabbit FITC (P.A.R.I.S biotech, Compiègne, France) and with goat anti-mouse TRITC (Santa Cruz Biotechnology) conjugated antibodies in blocking buffer for 2 hours at room temperature. Cells were finally mounted in VECTASHEIL Hard-Set™ mounting medium with DAPI (AbCys, Paris, France) and examined with a Zeiss Axiovert microscope equipped with epi-illumination.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to the PCEM lab member's for helpful discussion and critical reading of the manuscript. We also thank J-P. Saru, A. de Haze and C. Jullien for their excellent technical assistance. Contract grant sponsors : The Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), The Blaise Pascal University, The Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). Laurent Léotoing is recipient of a doctoral fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (grant sponsor : ARC).

### LITERATURE CITED

- Ahn JY, Liu X, Cheng D, Peng J, Chan PK, Wade PA, Ye K. 2005. Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol Cell* 18(4):435-445.
- Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veyssiere G, Morel L. 2004. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem* 279(15):14579-14586.
- Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* 24(3):985-996.
- Cheng S, Brzostek S, Lee SR, Hollenberg AN, Balk SP. 2002. Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* 16(7):1492-1501.
- Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. 2001. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem* 76:23-30.
- Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. 2002. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4(7):529-533.
- Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour AA, Boutin EL, Foster BA. 1992. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl* 13(6):465-475.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8(3):338-362.
- Demarest SJ, Martinez-Yamout M, Chung J, Chen H, Xu W, Dyson HJ, Evans RM, Wright PE. 2002. Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* 415(6871):549-553.
- Dhar SK, Lynn BC, Daosukho C, St Clair DK. 2004. Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J Biol Chem* 279(27):28209-28219.
- Fankhauser C, Izaurralde E, Adachi Y, Wingfield P, Laemmli UK. 1991. Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* 11(5):2567-2575.
- Feuerstein N, Mond JJ. 1987. "Numatrin," a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B lymphocytes. *J Biol Chem* 262(23):11389-11397.
- Feuerstein N, Spiegel S, Mond JJ. 1988. The nuclear matrix protein, numatrin (B23), is associated with growth factor-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts and with T lymphocyte proliferation stimulated by lectins and anti-T cell antigen receptor antibody. *J Cell Biol* 107(5):1629-1642.
- Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Ogryzko V, Avantiaggiati ML, Pestell RG. 2000. p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 275(27):20853-20860.
- Ghadimi MP, Sanzenbacher R, Thiede B, Wenzel J, Jing Q, Plomann M, Borkhardt A, Kabelitz D, Janssen O. 2002. Identification of interaction partners of the cytosolic polyproline region of CD95 ligand (CD178). *FEBS Lett* 519(1-3):50-58.
- Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, Pandolfi PP. 2005. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437(7055):147-153.



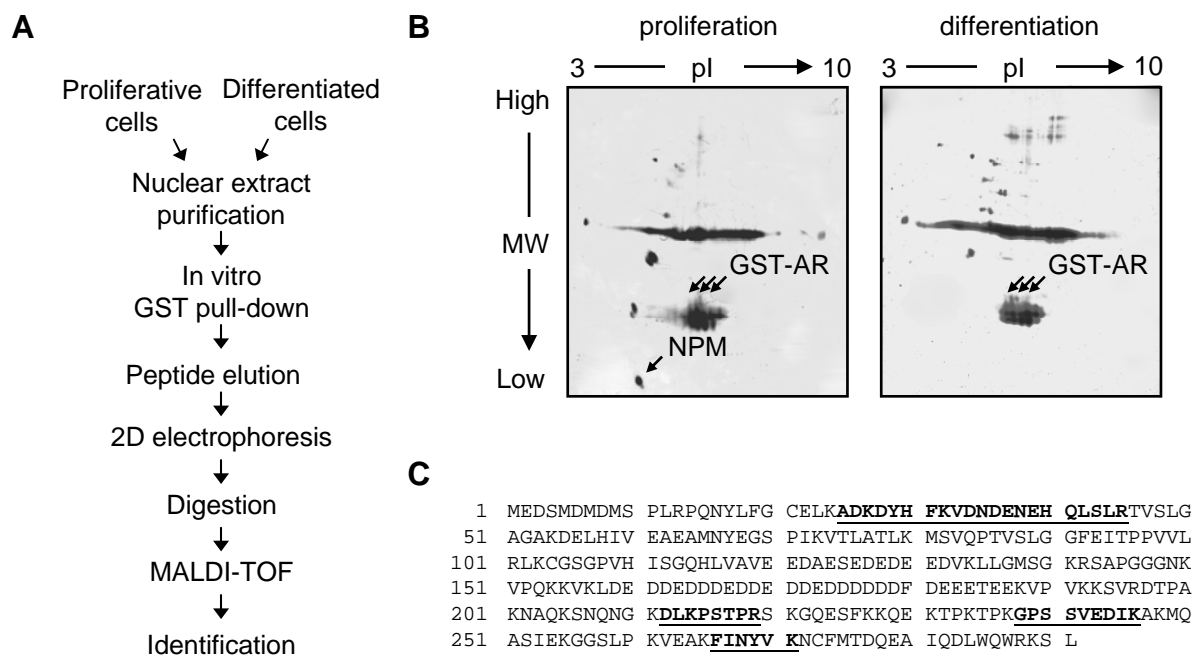
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. 2006. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6(7):493-505.
- Heinlein CA, Chang C. 2002. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocr Rev* 23(2):175-200.
- Hodgson MC, Astapova I, Cheng S, Lee LJ, Verhoeven MC, Choi E, Balk SP, Hollenberg AN. 2005. The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *J Biol Chem* 280(8):6511-6519.
- Hsu CY, Yung BY. 1998. Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncogene* 16(7):915-923.
- Huang WH, Yung BY, Syu WJ, Lee YH. 2001. The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication. *J Biol Chem* 276(27):25166-25175.
- Inouye CJ, Seto E. 1994. Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem* 269(9):6506-6510.
- Kang Z, Janne OA, Palvimo JJ. 2004. Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18(11):2633-2648.
- Langley E, Zhou ZX, Wilson EM. 1995. Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *J Biol Chem* 270(50):29983-29990.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. 1992. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *Embo J* 11(3):1003-1013.
- Leotoing L, Manin M, Monte D, Baron S, Communal Y, Veyssiere G, Morel L, Beaudoin C. 2006. Interaction between androgen receptor and EGF receptor signaling pathways: A molecular switch for epithelial cell differentiation. submitted.
- Mainwaring WI, Derry NS. 1983. Enhanced transcription of rRNA genes by purified androgen receptor complexes in vitro. *J Steroid Biochem* 19(1A):101-108.
- Mainwaring WI, Wilce PA. 1973. The control of the form and function of the ribosomes in androgen-dependent tissues by testosterone. *Biochem J* 134(3):795-805.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6):835-839.
- Manin M, Baron S, Goossens K, Beaudoin C, Jean C, Veyssiere G, Verhoeven G, Morel L. 2002. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J* 366(Pt 3):729-736.
- Manin M, Martinez A, Van Der Schueren B, Reynaert I, Jean C. 2000. Acquisition of androgen-mediated expression of mouse vas deferens protein (MVDP) gene in cultured epithelial cells and in vas deferens during postnatal development. *J Androl* 21(5):641-650.
- Manin M, Veyssiere G, Cheyvalier D, Chevalier M, Lecher P, Jean C. 1992. In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* 131(5):2378-2386.
- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. 1987. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8(1):1-28.
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. 2001. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 506(3):272-276.
- Okuwaki M, Tsujimoto M, Nagata K. 2002. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol Biol Cell* 13(6):2016-2030.
- Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC. 1999. Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 18(46):6322-6329.
- Roche PJ, Hoare SA, Parker MG. 1992. A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 6(12):2229-2235.
- Rosenfeld MG, Glass CK. 2001. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276(40):36865-36868.
- Savkur RS, Olson MO. 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 26(19):4508-4515.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850-858.
- Sun M, Yang L, Feldman RI, Sun XM, Bhalla KN, Jove R, Nicosia SV, Cheng JQ. 2003. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *J Biol Chem* 278(44):42992-43000.
- Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK. 2005. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* 25(17):7534-7545.
- Szebeni A, Herrera JE, Olson MO. 1995. Interaction of nucleolar protein B23 with peptides





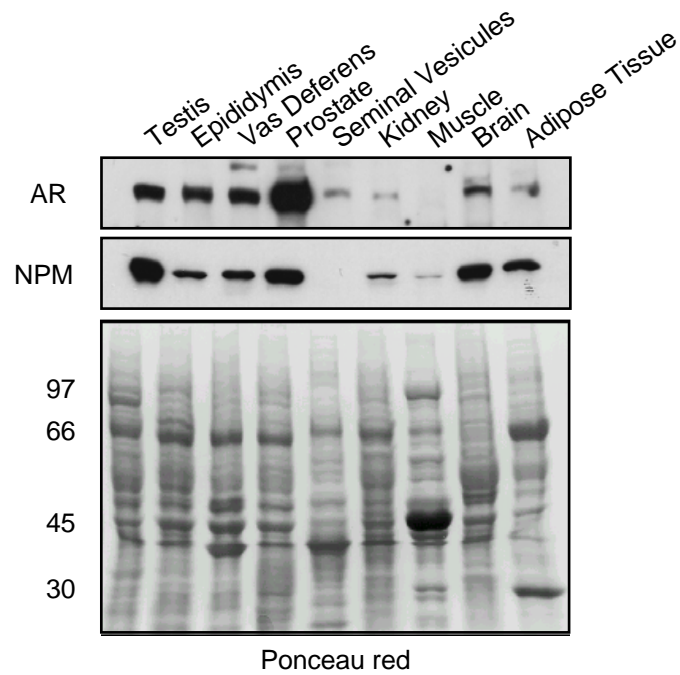
- related to nuclear localization signals. *Biochemistry* 34(25):8037-8042.
- Szebeni A, Olson MO. 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8(4):905-912.
- Takemura M, Sato K, Nishio M, Akiyama T, Umekawa H, Yoshida S. 1999. Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. *J Biochem (Tokyo)* 125(5):904-909.
- Tawfic S, Goueli SA, Olson MO, Ahmed K. 1993. Androgenic regulation of the expression and phosphorylation of prostatic nucleolar protein B23. *Cell Mol Biol Res* 39(1):43-51.
- Vernberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134:2307-2316.
- Weng JJ, Yung BY. 2005. Nucleophosmin/B23 regulates PCNA promoter through YY1. *Biochem Biophys Res Commun* 335(3):826-831.
- Xu J, Li Q. 2003. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17(9):1681-1692.
- Ye K. 2005. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4(9):918-923.
- Yun JP, Chew EC, Liew CT, Chan JY, Jin ML, Ding MX, Fai YH, Li HK, Liang XM, Wu QL. 2003. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* 90(6):1140-1148.





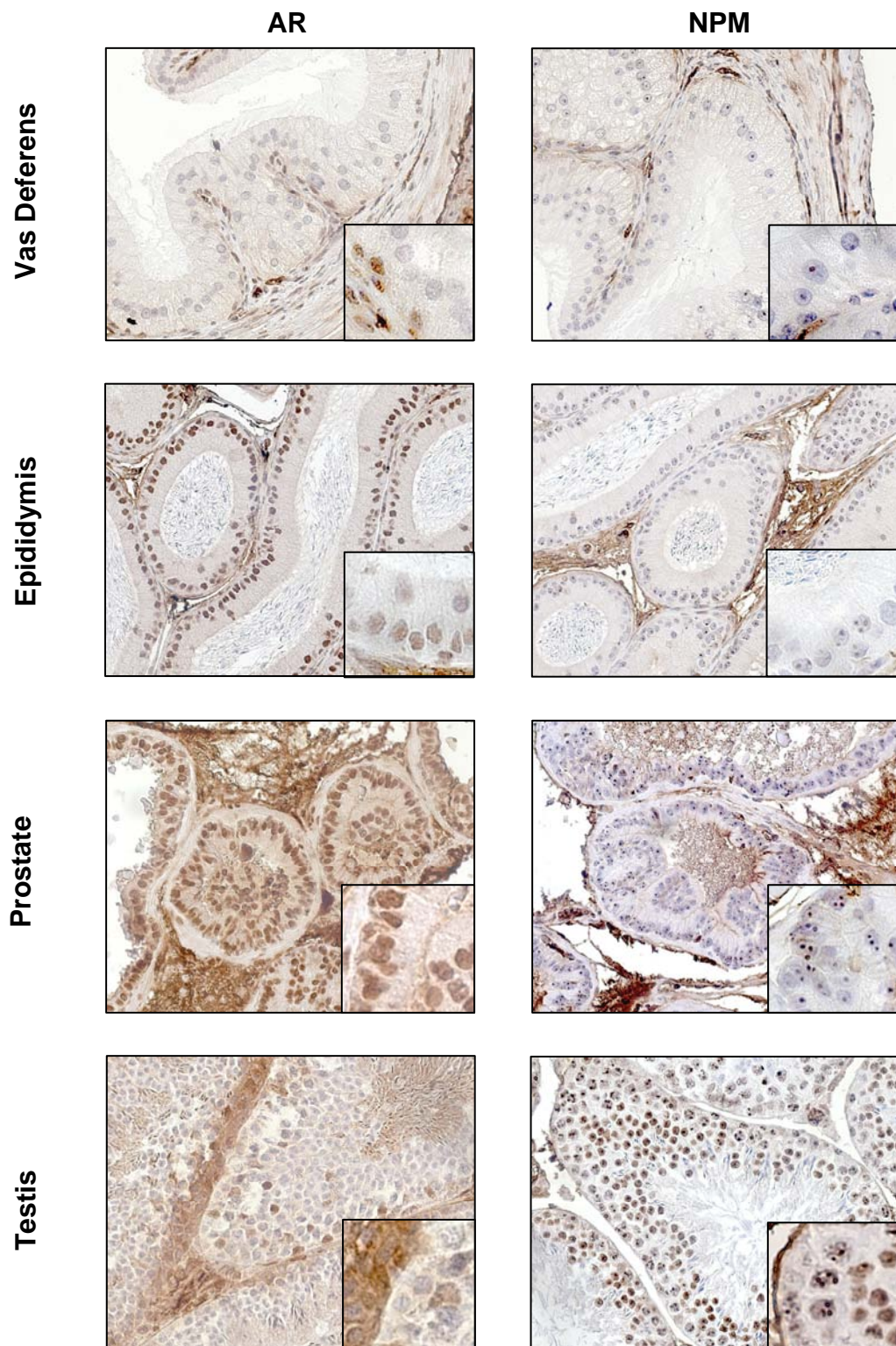
**Figure 1. Identification of nucleophosmin as an androgen receptor interacting protein.** (A) Scheme of the purification protocol. (B) Two-dimensional analysis of the AR protein complex. Proteins that bind to AR were purified by affinity chromatography using the C-terminal sequence of the human receptor (amino acid 679-919) fused to GST, separated by 2D electrophoresis and silver stained. A typical 2D gel is illustrated. (C) Amino acid sequence of NPM. Sequences of peptides identified by MS analysis of the purified 37-kDa protein in B are bolded and underlined.





**Figure 2. Expression of NPM in male murine tissues.** Tissue extracts were prepared from testis, epididymis, *vas deferens*, prostate, seminal vesicles, kidney, muscle, brain and adipose tissue of 20 wk-old wild-type males. Aliquots of each extracts (40 $\mu$ g/lane) were examined by western blot analysis for NPM and AR. The blots were stained with ponceau red to control for equal loading.

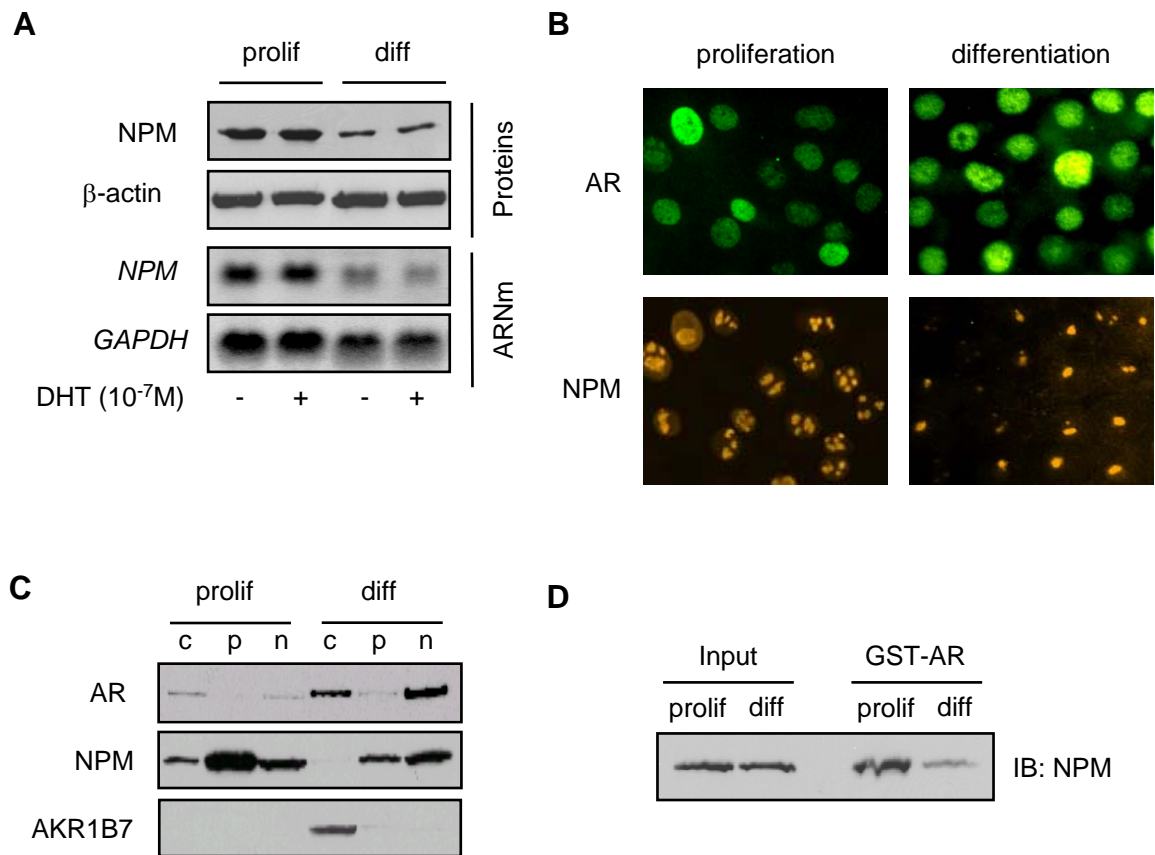




**Figure 3. Immunohistochemistry of murine reproductives organs.** Tissues from mouse *vas deferens*, epididymis, prostate and testis were sectioned and stained by standard immuno-histochemistry techniques with AR (left panels) or NPM (right panels). Antibody reactivity was visualized with diaminobenzidine (DAB) chromogen, and nuclei were counterstained with hematoxylin. Magnifications, x400 and x1000 (inserts).

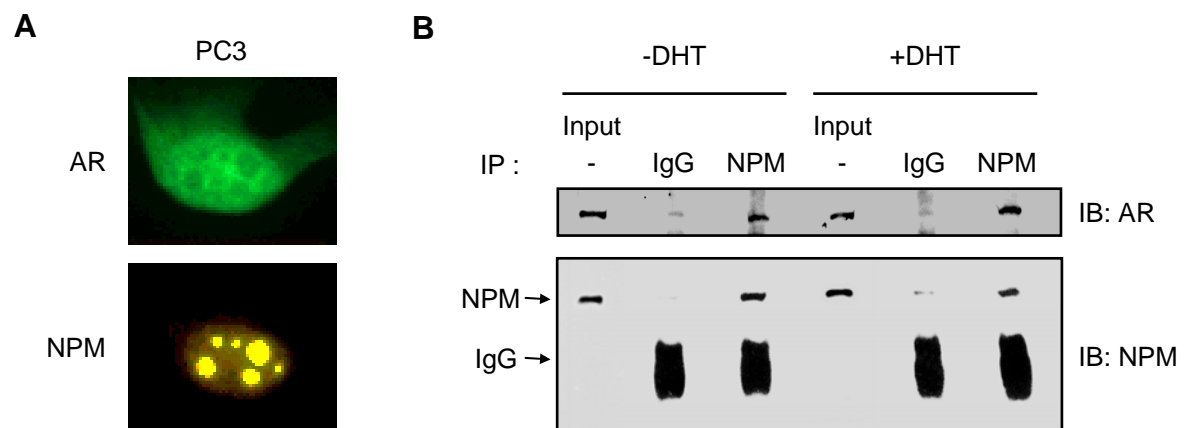






**Figure 4. Changes in NPM expression, localization and interaction after differentiation of VDEC.** (A) Expression levels of NPM in proliferating and terminally differentiated VDEC. Cells were maintained in proliferation (prolif) or allowed to differentiated (diff) as described in *Materials and Methods*. The cells were then treated with 100 nM DHT for 48 h or left untreated, after which whole cell extracts were prepared. Proteins (40  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE and western blot analysis was performed using an anti-NPM antibody. Samples were immunostained for  $\beta$ -actine as an internal reference (upper panels). Northern blot analysis of total RNAs from proliferating and differentiated VDEC. Blots were hybridized with  $^{32}$ P-labeled mouse full-length NPM cDNA probe. The expression of  $\beta$ -actine was used as an internal control (lower panels). (B) Localization of NPM in VDEC. Cells at different stages were cultured in presence of androgen and NPM was detected with AR using a fluorescent microscopy. (C) Changes in the subcellular distribution of NPM in VDEC following terminal differentiation. Equal amount of protein from cytosol (c), polyribosomal (p) and nuclear (n) extracts were prepared from cells treated with DHT (100 nM) for 48 h as described in Fig 2. (D) NPM preferentially binds the AR in proliferating VDEC. Immobilized GST-AR was incubated overnight at 4°C with nuclear extracts prepared from proliferating or differentiated cells, washed and denatured. Input and bound protein were subjected to SDS-PAGE and endogenously expressed NPM was detected by immunoblotting.





**Figure 5. Specific interaction between NPM and AR.** (A) Immunofluorescence localization of NPM and AR. pcDNA3.2-HA-NPM (HA-NPM) was co-transfected with GFP-tagged AR in PC3 cells. Cells were immunostained with an anti-HA primary antibody followed by a rhodamine-conjugated secondary antibody. (B) Cellular interaction of AR and NPM. PC3 cells were transiently transfected with AR. Equal amounts of whole-cell lysates were blotted with AR and NPM antibodies to detect expression levels of the two proteins or subjected to immunoprecipitation (IP) with normal goat IgG or anti-NPM antibody. The precipitated fractions were then resolved by SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-NPM or anti-AR antibody.



## **II. La nucléophosmine interagit avec le récepteur des androgènes et contrôle son activité dans le cancer de la prostate.**

Les résultats précédents rapportent l'identification de la nucléophosmine comme un nouveau partenaire du récepteur des androgènes. Ces deux protéines sont largement représentées au niveau protéique dans les tissus androgéno-dépendants et notamment dans la prostate. De plus, nous avons mis en évidence une interaction plus forte de AR et NPM lorsque les cellules sont dans un état prolifératif. A partir de ces observations, il semblait intéressant d'étudier leur interaction fonctionnelle dans le contexte de la pathologie tumorale prostatique.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une accumulation plus importante de la nucléophosmine dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain au niveau de biopsies d'adénocarcinomes prostatiques ; le récepteur des androgènes présente un profil d'accumulation semblable. L'analyse de coupes réalisées après prostatectomie révèle d'une part, une expression plus forte de la nucléophosmine dans les cellules épithéliales cancéreuses par rapport aux cellules saines, et d'autre part, un plus grand pourcentage de cellules qui l'expriment fortement. Dans des cellules tumorales prostatiques LNCaP, le récepteur des androgènes et la nucléophosmine sont colocalisés au niveau de la fraction nucléaire, principalement lorsque les cellules sont cultivées en présence d'androgènes. Les deux protéines interagissent *in-vivo* et cette interaction mobilise différents domaines de chacun des partenaires. Alors que la surexpression de NPM s'accompagne d'une plus forte accumulation du récepteur des androgènes, la diminution du niveau protéique de NPM grâce à des ARN interférents, se traduit par une baisse d'accumulation de AR et une répression de la transcription dépendante des androgènes sur le gène cible endogène *PSA* et sur un vecteur rapporteur luciférase dirigé par le promoteur du gène *PSA*. Le niveau de régulation protéique de AR par NPM n'implique pas la voie du protéasome. En revanche, la nucléophosmine pourrait participer à la régulation de la transcription dépendante des androgènes en favorisant la fixation de AR à ses éléments de réponse. Enfin, l'étude *in-vivo* du promoteur du gène *PSA* met en évidence un recrutement spécifique de AR sur ses AREs en réponse à l'hormone, et une dissociation également spécifique de NPM sur ces mêmes AREs. Ainsi, la dérégulation de l'expression de la nucléophosmine dans les cellules tumorales de la prostate pourrait être à l'origine d'une expression et d'une activité altérées du récepteur des androgènes, et participer à la tumorigenèse prostatique.



# Nucleophosmin interacts with and controls the androgen receptor in prostate cancer.

<sup>1</sup>Laurent Léotoing, <sup>2</sup>Léo Meunier, <sup>1</sup>Michèle Manin, <sup>2</sup>Claire Mauduit, <sup>2</sup>Myriam Decaussin, <sup>2</sup>Mohamed Benahmed, <sup>1</sup>Georges Veyssière, <sup>1</sup>Laurent Morel & <sup>1</sup>Claude Beaudoin.

<sup>1</sup>UMR 6547 CNRS – Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II, 24 avenue des landais, 63177 Aubière cedex, France. <sup>2</sup>U 407 INSERM – Faculté de Médecine Lyon Sud, BP12, 69921 Oullins cedex, France.

Corresponding Author : Laurent Morel, UMR 6547 CNRS – Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II, 24 avenue des landais, 63177 Aubière cedex, France

Short title : Nucleophosmin, Androgen Receptor and Prostate cancer

## Abstract

The promotion and progression of prostate cancer (PCa) are associated to an active androgen receptor (AR) signalling. AR activities are modulated by a variety of co-factors amongst which we identified the histone chaperone nucleophosmin (NPM). We show that NPM is over-expressed in prostate tumors compared to normal adjacent tissues in both hormone-dependent and independent cancers. Using LNCaP cells, NPM was detected in nucleoli with a small nuclear fraction that co-localizes and interacts with AR. This interaction is critical for AR function as an anti-NPM siRNA down-regulated AR transcriptional activities and a co-incubation of NPM and AR increased the nuclear receptor DNA binding on response elements. We further demonstrated by DNA ChIP that AR recruitment *in vivo* on the PSA promoter is associated to a chromatin binding pattern of NPM specific to AREs occupancy. Finally, NPM was shown to also regulate AR stability as NPM over-expression increased AR accumulation while NPM knock-down reduced both AR and PSA levels. Taken together, the above data demonstrate that high levels of NPM could be responsible of AR over-expression in prostate adenocarcinoma and that the AR-NPM complex can regulate nuclear hormone receptor-mediated transcription to promote tumoral progression.

## Introduction

The development and progression of prostate cancer, which is one of the most frequently diagnosed cancer in males in western countries, is mainly supported by a deregulation in androgens signalling (1). When prostate cancers have progressed to metastatic carcinomas that cannot be treated locally, patients are treated in order to decrease the circulating level of androgens and to inhibit the transcriptional activities of the androgen receptor (AR), the cellular mediator of androgens actions. Nevertheless, the disease often escapes from hormonal treatment and gains an androgen-independent growth phase. Interestingly, it is still correlated to an active AR. Upon DNA binding, AR recruits components of the basal transcription machinery and influences either the up or down regulation of gene expression. This ability of AR to enhance transcription relies on its interaction with co-activators and co-repressors depending on whether they enhance or inhibit AR transcriptional activities (2, 3). The type I co-regulators function primarily with the nuclear receptor at the target gene promoter to facilitate DNA occupancy, chromatin remodelling, or the recruitment of general transcription factors associated with RNA polymerase II holocomplex (4). Examples of these co-regulators are the co-activators cAMP response element (CREB) binding protein (CBP)/p300 (5) and SRC1 (6) which possess histone acetyltransferase (HAT) activity;

the co-repressor ARR19 which recruits an histone deacetylase HDAC4 (7). The type II co-regulators, amongst which the protein ARA70, enable the proper folding of AR, control the AR trafficking and influence the ligand binding activity (8). We have recently identified NPM as a novel AR interacting protein and observed that NPM and AR are co-expressed in androgen-sensitive tissues including the prostate. Nucleophosmin (NPM/NO38/numatrin) is a major non-ribosomal nucleolar phosphoprotein that can prevent aggregation of proteins (9) and stimulate protein import into the nucleus (10). More importantly, NPM was shown to bind to histones, to mediate nucleosome formation and to decondense chromatin (11). This histone chaperone activity can regulate chromatin transcription by disrupting the nucleosomal structure in an acetylation-dependent manner, resulting in the transcriptional activation (12). NPM can also regulate transcription by interacting with transcription factors such as YY1 (13-15), p53 (16-19) and NF-κB (20).

It was suggested that aberrant or inappropriate activation of the AR facilitates the formation of prostate hyperplasia or neoplasia (21, 22). We therefore asked the question of a control of AR signalling by NPM in tumor prostate cells. Herein, we demonstrate that NPM is over-expressed in prostate cancer tissue and critical for AR signalling. We show that NPM and AR are co-localized and interact in





LNCaP prostate cancer cells and that the interaction involves multiple domains. We then demonstrated that NPM can exert its effect on AR activity through multiple mechanisms. This work underlines a key physiological role of NPM on AR signalling in prostate tumor cells.

## Results

### NPM is over-expressed in prostate cancer tissue.

Using western-blotting, we found that NPM is over-expressed in tumoral versus adjacent normal prostate micro-biopsies collected on six patients after radical prostatectomy (fig 1A left): the mean value of NPM quantification in tumoral tissue is 5 fold higher than in normal tissue (left graph). An interesting observation is the similar pattern of AR accumulation in these tissue specimens with an 8 fold over-accumulation in tumoral tissue (fig 1A, right graph). NPM expression was also analyzed in paraffin embedded sections of clinically characterized human prostate cancers obtained from patients treated or not with hormonal therapy. NPM was detected both in epithelial and stromal compartments (fig 1B). In cancer sections, the intensity of the staining only varied in epithelial cells where it was found higher than in normal cells (fig 1B). Such an enhanced expression of NPM seems to be independent of a hormonal treatment or the Gleason score. In addition, there is a higher proportion of NPM highly expressing cells in the tumoral tissue.

### AR and NPM co-localize in the nucleus of prostate cancer cells.

We then studied AR and NPM cell localization by using immunofluorescence experiment in LNCaP cancer cells cultured in the absence or in the presence of 10nM DHT for 24 hours. Phase contrast microscopy and DAPI staining revealed cell shape and nuclei respectively (fig 2a, f, k and b, g, l). In the absence as well as in the presence of hormone, NPM exhibits a predominant nucleolar staining but also a specific nuclear staining as it was already described (23) (compare d or i with non-specific IgG plus secondary antibody in n). In the absence of hormone, AR staining is diffuse in the entire cells (fig 2c). Incubation with 10nM DHT relocates AR in the nucleus (fig 2h). The merge images e and j show that AR and NPM are co-localized in the nuclei of LNCaP cancer cells more specifically when the cells are cultured in the presence of DHT.

### AR and NPM interact in prostate cancer cells.

Wondering whether AR and NPM could interact *in-vivo*, we managed co-immunoprecipitation experiments. Endogenous AR in LNCaP cell lysates treated or not with 10nM DHT for 36 hours was shown to specifically co-immunoprecipitate with NPM as no signal was detected with non specific IgG (fig 3A, compare IP AR vs IP IgG lanes). The ability of the two proteins to

associate in the same immune complex was independent of the presence of androgens. Once again, the two proteins were co-immunoprecipitated when an anti-NPM antibody was used as a bait to isolate NPM containing complexes (fig 3B) and this was done independently of the presence of hormone.

### AR and NPM interact through multiple domains.

To test which functional domains of AR are required for NPM interaction, GST-AR deletion constructs were used in pull down assays with NPM-HA *in-vitro* synthesised (IVS) or over-expressed in PC3 cell (CL for Cell Lysate) (fig 3C). The IVS NPM-HA bound weakly the N and C terminal domains of AR and strongly to the DNA Binding Domain fused to the Hinge region. There was no such a difference with the CL NPM-HA indicating that other cell proteins may participate in this binding. We then tested which functional domains of NPM bind to the AR protein (figure 3D). The binding activity of *in vitro* synthesised (IVS) or over-expressed AR in PC3 cell lysate (CL) were then monitored against the full length, the Oligomerization domain (OligoD), the central Acidic/Nuclear Localization Signal domain (Ac/NLS) and the HeteroDimerization/Nuclear Binding Domain (HeD/NBD) of NPM (24). The full length, OligoD and HeD/NLS exhibited permanent binding with IVS and CL AR although the relative affinity of the domains seems to change with the method of AR synthesis. Once again, this may underline the involvement of other interacting proteins in the cell lysate. The Ac/NLS showed no binding activity.

### NPM is critical for AR stability and transcriptional activity.

To evaluate the role of NPM on AR expression, AR negative PC3 prostate cancer cells were co-transfected with increasing amounts of an expression vector for HA-tagged NPM and with a unique dose of an expression vector for AR (fig 4A). NPM over-expression induced a dose-dependent increase in AR protein level and this effect was strengthened in the presence of DHT thus suggesting that NPM is able to stabilize AR protein at basal level as well as after DHT induction. As one major mechanism by which NPM could regulate AR stability is the protection against proteasomal degradation, we analyzed the effect of the proteasome inhibitor MG132 on endogenous AR levels in LNCaP cells knocked-down or not for NPM. As shown in fig 4B, efficiency of the knock-down was underlined by the drastic decrease of NPM level in siNPM treated cells. MG132 treatment efficiency was monitored by increased levels of p53, a well known proteasome-regulated protein (25). Treatment with MG132 did not fully restore AR levels in NPM siRNA treated cells compared to control, indicating that the inhibition of proteasome-dependent degradation by MG132 could not substitute for the absence of NPM. Taken together, these results



show that NPM increases AR stability by a mechanism independent of the proteasomal pathway that is not yet determined.

We therefore investigated the physiological effects of NPM knocking-down on AR and its endogenous *PSA* target gene levels in LNCaP. As shown in fig 4C, NPM siRNA strongly reduced AR protein accumulation in response to DHT (12 fold vs 30 fold in control cells) and a parallel decrease (2x) in the accumulation of the *PSA* target gene product. As NPM siRNA had no effect neither on the level of the PI3K p85 subunit, which has a similar half-life to AR (26), nor on the level of actin, these results suggest that NPM can specifically regulate AR nuclear receptor expression, leading to variations in its activity on target genes such as the prostate cancer marker *PSA*.

NPM has already been shown to directly bind to and modulate the activities of several transcription factors (14, 16, 18). We therefore investigated the role of NPM on AR transcriptional activity in a physiologically relevant cellular context of the AR-positive LNCaP cancer cells. NPM accumulation was knocked-down using specific siRNA as described above (fig 4C), and the resulting AR transactivating activities were tested using a luciferase reporter driven by the 5.8 kb *PSA* promoter (27). Luciferase activity was greatly enhanced in control siRNA transfected cells in response to DHT (fig 4D, left panel). In contrast, it was considerably and significantly reduced (by 80%) in NPM knocked down cells. The basal level of luciferase activity without DHT was not affected by NPM down-regulation suggesting that NPM siRNA affects specifically induced-transcriptional activity of AR but not its basal activity. NPM is a key factor in rRNA processing (28). Nevertheless, the effect of NPM down-regulation was unlikely the result of a general effect on transcription or translation, as a constitutive CMV-Luc construct was insensitive to NPM reduced expression (fig 4D, right panel).

#### **NPM increases DBD binding activity of AR.**

To understand how NPM can regulate AR transcriptional activity, we hypothesized that NPM could modulate the DNA binding activity of AR on an ARE using EMSA assays. This hypothesis was strengthened by the fact that NPM highly bind the AR DBD *in-vitro* (fig 3C). First was tested the capacity of the recombinant GST-DBD fusion protein (DNA Binding Domain of AR) to bind to the distal ARE of the AKR1B7 promoter (29). As shown in fig 5A the GST-DBD is able to bind DNA and to form a complex with the labelled probe used (lane 2). The specificity of this binding was controlled by monitoring the loss of the complex when an excess of cold specific competitor was added (lane 3) but not with an excess of non-specific competitor corresponding to the Liver X Receptor response element cold probe (lane 4). We also ensured that neither the GST (lane 5) nor the GST-NPM (lane 6) alone could form a complex with the probe. Second, we tested the effect of an addition of GST-

NPM on the DNA binding activity of GST-DBD. As shown in fig 5B, NPM increased the DNA binding activity of AR in a dose dependent manner (lane 4 and 5) while the GST alone had no effect (lane 2 and 3). No band shift was formed with GST-NPM. Addition of an antibody against NPM reduced in part the activity of NPM on AR binding activity, probably by interfering with the binding of NPM and AR (lane 7). The same results were obtained with a recombinant NPM-histidine-tagged instead of GST-NPM (data not shown).

Finally, we measured the effect of the deletion of the N and C-terminal domains of NPM on its capacity to modulate AR DNA binding activities. The full length NPM (fig 5C, lanes 2-5) as well as the two deletion mutants (lanes 6-9, 10-13) increased the DNA binding activity of AR in a dose dependent manner.

#### **NPM and AR present a specific binding pattern on androgen response elements of the *PSA* promoter and regulatory regions *in vivo*.**

The effects of NPM on AR transcriptional and DNA binding activities suggest that it may be involved in the regulation of AR transactivation function by an action at the DNA level. We therefore used chromatin immunoprecipitation (ChIP) to determine whether AR and NPM are both present on the AREs of the androgen responsive gene *PSA* in LNCaP cells incubated for 2 hours in the absence or in the presence of 10 nM DHT. Cell extracts were subjected to immunoprecipitation using AR and NPM antibodies and rabbit or goat control IgG. Then the occupancy on the proximal promoter (ARE I and ARE II) and the enhancer (ARE III) of the *PSA* gene (figure 6A) was determined using quantitative real-time PCR. A *PSA* 3' non transcribed fragment (3'NT) and a  $\beta$ -*ACTIN* promoter region were used as a negative control to check the specificity of AR interactions with DNA regions. Treatment with DHT resulted in a strong recruitment of AR on the enhancer (ARE III) and a weaker recruitment on the promoter (ARE I and II) (fig 6B) as it was already described (30). There was no binding of AR on the 3'NT and  $\beta$ -*ACTIN* regions. In the absence of DHT, NPM was present on the three AREs with a higher recruitment on the ARE I (fig 6C). The NPM was also found on the 3' NT and  $\beta$ -*ACTIN* regions. This finding could be related to its DNA binding and histone chaperone activities (11, 24). Nevertheless, the presence of androgens significantly decreases the binding of NPM on the AREs but not on the 3' NT nor on the  $\beta$ -*ACTIN* promoter. Although we could expect a recruitment of NPM in the presence of hormone, this result is in agreement with the absence of NPM in the AR/ARE complex we observed in gel shift experiment (fig 5B).



## Discussion

We previously identified nucleophosmin (NPM) as an androgen receptor (AR) interacting protein and showed that these two proteins are co-expressed in androgen-sensitive tissues, including prostate (unpublished data). This is the first report of the interaction between NPM and a nuclear receptor. Previous studies conducted on NPM regulation by androgens (31, 32) demonstrated that after castration, prostatic NPM is no longer phosphorylated by Casein Kinase 2 leading to its down-regulation. Nevertheless, until our study, the control of AR signalling by NPM was not considered. In this publication, we demonstrate that NPM is over-expressed in prostate adenocarcinoma, interacts with AR in prostate cancer cells and modulates its activity by several mechanisms.

Several arguments let suppose that NPM control AR activity in the nucleus. First, using immunofluorescence experiment in LNCaP cells, we have clearly underlined that NPM and AR are co-localized in the nucleus of DHT treated cells, and more specifically in the nucleoplasm. Second, we have demonstrated that NPM is critical for AR transcriptional activity as a NPM knock-down resulted in a decrease of exogenous as well as endogenous AR target gene expression in response to DHT. The mechanism we have underlined is the ability of NPM to increase the DNA binding activity of AR. As we also found that *in-vitro* synthesized NPM has a great affinity for the DNA Binding Domain of AR, we suggest that NPM can drive AR folding in a conformation that favours a better affinity to its ARE. Similarly, Kondo *et al.* demonstrated that NPM can interact with the anti-oncogenic transcription factor IRF1 and inhibit its DNA binding activity, resulting in the loss of its transcriptional activity (33). Interestingly, The EMSA experiments did not reveal the presence of NPM in association with AR on DNA since neither the addition of GST-NPM, a 65 kDa fusion protein, resulted in a shift, nor the addition of an antibody against NPM in a super-shift. This let us think that the affinity of AR-DBD to NPM is lower than its affinity to DNA and thus, while AR-DBD is being bound to DNA, it no longer interacts with NPM. It has to be noted that gel shift assay was performed with AR-DBD because the AR/DNA complex is difficult to obtain with the full length AR protein. However, as NPM also interacts with the N and C terminal domains of AR, we can suppose that *in vivo*, the association with NPM would be stronger and effective on DNA. A recent work of Mai *et al.* has demonstrated that NPM is recruited on its own promoter in association with the transcription factor YY1, p300 and the Hepatitis C virus (HCV) core protein (15). In the same way, using chromatin immuno-precipitation we have demonstrated that NPM is already present on the promoter (ARE I and ARE II) as well as the enhancer (ARE III) of the *PSA* gene, and that this binding is highly decreased in response to DHT. Whether it is surprising, such a pattern of

recruitment on the *PSA* gene AREs was already described for the cochaperone Bag-1L in response to DHT (34). NPM plays a role of chaperone for several proteins, especially histones (11). Actually, NPM has the ability to assemble nucleosomes on DNA but also to enhance acetylation-dependent chromatin transcription by disrupting the nucleosomal structure after being acetylated by p300 (12). Such a mechanism could be involved in AR transcription as the co-regulator p300 is recruited on the *PSA* promoter and enhancer in response to DHT (35). Thus, we can suppose that NPM is ubiquitously bound on DNA and can help AR to acquire a suitable conformation to bind its AREs then remodelling the chromatin structure to allow the initiation of transcription.

The second mechanism identified is the ability of NPM to stabilize AR. We have demonstrated that NPM is able to increase AR level in a dose-dependent manner regardless of whether DHT is present in the medium. Modulation of AR stability thus can lead to differential activity on its target genes. This result is sustained by the fact that a knock-down of NPM by siRNA leads to a decrease of AR and its target gene *PSA* levels. Such an activity of NPM has already been reported for the regulation of the Proliferating Cellular Nuclear Antigen (PCNA) by the transcription factor YY1 (14). NPM has also been shown to regulate the stability of p53 in human fibroblasts (16); NPM over-expression leads to a higher level of p53 in a transcriptionally competent state as the level of hdm2 and p21 are also increased. If NPM is principally localized in the nucleolus, it has also been described to shuttle between the nucleolus, the nucleus and the cytoplasm (36). As a chaperone, NPM regulates nucleo-cytoplasmic trafficking through its direct binding to the nuclear localization signal (NLS) of target proteins. This is the case of the cell-cycle-related protein p120 (37), the HIV-1 Rev protein (38) and also the retinoblastoma protein Rb (39). In the same way NPM could bind the AR NLS to bring it into the nucleus since we have found that the AR NLS which is localized in its DBD-hinge region has the higher affinity for the NPM. Moreover, this activity of NPM seems to be dependent on its phosphorylation status as phosphorylation at sites in the highly acidic segments of the protein by the Casein Kinase 2 (CK2) enhances the stimulatory effect (40). An intriguing correlation is that CK2 is the rate-limiting factor for NPM phosphorylation in the prostate gland after androgen deprivation (31). Then, in response to androgens, the CK2 could phosphorylate NPM, leading to its protection against proteolytic degradation and import stimulation of NLS containing proteins in the nucleus including AR. Nevertheless, in a fractionation assay (data not shown) we have seen that knocking-down NPM resulted in the decrease of the nuclear fraction of AR as well as the cytoplasmic fraction. If this trafficking activity of NPM had been predominant on AR



regulation, we should have observed mainly a decrease of the nuclear fraction. Thus, our experiment did not permit to conclude on this NPM's role.

NPM has been shown to be higher expressed in proliferating cells whether they are normal or not. For example, NPM is more abundant in hypertrophic rat liver and Novikoff hepatoma than in normal rat liver (41), in human hepatocellular carcinoma than in normal liver (42), in neoplastic than in non-neoplastic colorectal mucosa (43), or is down-regulated during leukaemia HL-60 cells differentiation (44). Although there are controversial reports on NPM level in prostate cancer (23, 45), our work brings arguments for NPM over-expression in prostate cancer compared to adjacent normal tissues, a change which is correlated with increased AR levels. Considering NPM effect on AR signalling demonstrated in our study, we propose that this deregulation could be a reason of aberrant expression and activity of AR in such cells, taking part in the prostate tumorigenesis.

Herein, we have highlighted a new role of Nucleophosmin by demonstrating that it can act as a new co-regulator of androgen-receptor in prostate cancer through stabilization of AR protein and stimulation of its transcriptional activity by increasing its DNA binding activity. Our advanced studies suggest that the co-regulatory function of NPM is not restricted to AR but also participate in the regulation of other steroid hormones receptors. Further investigations are currently in progress.

## Methods

**Plasmids.** The pPSA61-luc were kindly provided by Pr TRAPMAN (Rotterdam, Netherlands). The rat pCDNA-NPM1-HA was obtained by subcloning the NPM1 fragment (pGEM-JH1, OLSON M.O.J Minnesota) digested by HindIII, XhoI in a pCDNA3-HA plasmid. The GST-AR fusion constructs were cloned as described previously (46). The GST-NPM fusion constructs were cloned in the pGEX-4T1 (Amersham Biosciences) using the BamHI, XhoI digested fragments generated by PCR amplification onto the pCDNA-NPM1-HA plasmid using the following primers: NPM OligoD forward 5'-GATCGGATCCGAAGACTCGATGGACATGGAC-3', NPM OligoD reverse 5'-GATCCTCGAGTTATACAGCTACTAGGTGCTGTC-3', NPM Ac-NLS forward 5'-GATCGGATCCGAGGAAGATGCAGAGTCAGAA-3', NPM Ac-NLS reverse 5'-GATCCTCGAGTTAAGATTTCTTCACTGGAACCTT-3', NPM Hetero-D forward 5'-GATCGGATCCCCAGTGAAGAAATCTGTACGA-3', NPM Hetero-D reverse 5'-GATCCTCGAGTTAAAGAGACTTCCTCCACTG-3'. The human NPM OligoD-NLS and NPM NLS-HeteroD were cloned in the pET3E-His-Flag using the BamHI, XhoI digested fragments generated by RT-PCR

amplification onto a human library of breast cDNA using the following primers: NPM OligoD-NLS forward 5'-

GATCGGATCCACGAAGACTCGATGGACATGGAC-3', NPM OligoD-NLS reverse 5'-GATCCTCGAGTTAAGATTTCTTCACTGGAACCTT-3', NPM NLS-HeteroD forward 5'-GATCGGATCCACGAGGAAGATGCAGAGTCAGAA-3', NPM NLS-HeteroD reverse 5'-GATCCTCGAGTTAAAGAGACTTCCTCCACTG-3'.

**Cell culture and Transfections.** PC3 cells were maintained in DMEM medium (Invitrogen, Cergy Pontoise France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells plated in 100 mm dish at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells/plate in DMEM were transfected using Exgen 500 (Fermentas GMBH, St Leon-Rot, Germany). LNCaP and T47D cells were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS. Cells plated in 6 wells-plates at a density of  $3 \times 10^5$  cells/well in RPMI 1640 were transfected in OPTI-MEM (Invitrogen) using Metafecten (Biontex Laboratories, GMBH, Munich Germany) for siRNA alone or Lipofectin (Invitrogen) for siRNA in combination with a reporter (1 µg). We used a pool of two RNA duplexes of 19nt and two-dT overhang against the nucleophosmin at 50nM each (sense 5'-CCACAGAAAAAAGUAAAACTT-3' and sense 5'-UGAUGAAAAUGAGCACCAGTT-3', MWG-Biotech, Courtabeuf, France). As a control, we used a duplex of 19nt and two-dT overhang against GFP at 100nM (sense 5'-ACTACCAGCAGAACACCCCTT-3'). After 12 hours, the medium was replaced by phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 5% of charcoal-stripped FCS and with 10nM DHT or ethanol as a control for 36 hours. Transfected cells were harvested in 100 µl Promega luciferase lysis buffer (Promega, Charbonnières, France) and 20 µl were analysed for luciferase activity using a YELEN kit (Yelen, Ensue la Redonne, France). Each experiment was repeated 3 times in triplicate.

**Subjects.** For Western-blotting studies, prostate tissue samples were obtained from 6 patients with a mean age of 64.1 years (range 53 to 73) who underwent radical prostatectomy between January 2002 to June 2005 in the department of Urology at Centre Hospitalier Lyon Sud. Immediately after prostate removal (delay < 10 min) small pieces of tissues (0.5 to 1 cc) were gross dissected by the pathologist, in the left, the right peripheral zone and in the transitional area. All fragments were snap frozen and stored in liquid nitrogen until analysis. To characterize the tissues, histological analysis of a frozen section was performed for each sample by the same pathologist (MD) before any extraction.

For immunohistochemical studies, the paraffin-embedded tissue sections were obtained from 50 cases





of radical prostatectomy or endo-urethral resection. The fragments were either fixed in Bouin's liquid or neutral formol. All the cases were reviewed by a pathologist (MD) to confirm the malignancy and the Gleason Score. In the blocs chosen were the ones from the patient selected for the western blotting analyses, the others blocs were chosen because they displayed, on the same slide, tumoral and non-tumoral tissues. Tumors were classified as high grade when the Gleason score was 7 or higher and as low grade when the score was 6 or lower.

The ethics committee of the medical faculty and the state medical board agreed to these investigations and an informed consent was obtained for all patients.

#### **Protein extraction and Western-Blot Analysis.**

Human tissues sections were crushed in 500 µl TRIzol reagent (Invitrogen) and extracted according to the manufacturer's instructions. Cells were collected in NaCl Buffer (0.42 M NaCl, 20 mM Hepes, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 25 % glycerol, 0.1 % NP-40, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin). The cells homogenates were cleared by centrifugation at 15000g for 15 min. Proteins concentrations were measured using the Bio-Rad protein assay kit (Biorad, Marnes la Coquette, France). Proteins were analysed by western-blotting using the following antibodies: rabbit polyclonal anti-AR (PG-21 Upstate Biotechnology, Southampton, UK), goat polyclonal anti-NPM (C19, Santa Cruz Biotech. Santa Cruz, USA), rabbit polyclonal anti-NPM (3542 Cell signalling) for biopsies analyses, rabbit polyclonal PSA (Gift from Dr Verhoeven, KU Leuven), rabbit polyclonal anti-HA (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), rabbit polyclonal anti-p85α (06-195 Upstate), mouse monoclonal anti β3-tubulin (clone TUJ 1, Stem cell technology), rabbit polyclonal anti-Actin (C11 Sigma-Aldrich). As second antibody either the horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit (P.A.R.I.S Biotech, Compiègne, France) or the rabbit anti-sheep (Upstate Biotechnology) or donkey anti-goat (Santa Cruz) immunoglobulin G were used. Detection was realized by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer Life Science, Courtabeuf, France).

**GST pull-Down.** GST pull-Down analysis was realized as previously described (46). HA-tagged AR and NPM were obtained *in-vitro* using the TNT T7/T3-coupled reticulocyte lysate system (Promega) or *in-vivo* by transfecting PC3 cells with appropriated plasmids. The bound complexes were analysed by western-blotting using the rabbit polyclonal anti-HA (Sigma). Fusion proteins were stained with S-Ponceau to ensure equal loading.

**Immuno-precipitation.** LNCaP cells treated or not for 36 hours with 10nM DHT were lysed in IP buffer (150 mM NaCl, 0.1 % triton, 5mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA). Cell lysates were centrifuged and 500µg of total proteins were subjected to immunoprecipitation

using anti-AR (PG21), anti-NPM (C19) or purified IgG as control overnight at 4°C. The immune complexes were captured using Protein A or G-sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) during 3 hours at 4°C. After four washes with the IP buffer, the immune complexes were directly eluted in the denaturing loading buffer and analysed by western blotting.

**Immuno-fluorescence.** LNCaP cells plated on glasses were treated or not for 24 hours with 10nM DHT before being fixed in paraformaldehyde 4% for 15 min., permeabilized in 0.2% triton for 15 min and incubated with antibodies specific for the indicated proteins: rabbit polyclonal anti-AR (PG-21), mouse monoclonal anti-NPM (325200 Zymed, Invitrogen) overnight at 4°C in PBS containing 0.5% serum. Immune complexes were detected using either a TRITC-conjugated anti-rabbit-IgG (DAKO, Cambridgeshire, UK) or FITC-conjugated anti-mouse-IgG (Santa-Cruz). Glasses were mounted in Vectashield DAPI containing Medium (Abcys,SA, Paris France).

**Immuno-histochemistry.** Paraffin blocks of fixed prostate tissues were sectioned at 5 µm. The sections were mounted on Superfrost plus glass slides, deparaffinized, hydrated and heated 20 min at 93-98°C in citric buffer (0.01 M, pH 6). Then, the Envision<sup>+</sup> kit (Dakopatts, Glostrup, Denmark) was used according to the manufacturer's recommendations. The sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted in the diluent at 1/250 for NPM. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted in Faramount. The immunostaining was evaluated by two independent pathologists, blinded as to the clinicopathologic parameters.

#### **Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP).**

LNCaP cells (25 x 10<sup>6</sup> cells) were cultured in phenol red-free RPMI medium supplemented with 5% charcoal stripped FBS for 72 hours. Cells were then treated with or without 10nM DHT for 2 additional hours. Experiments were realized as previously described (30). Immunoprecipitations were realized using anti-AR (PG21), anti-NPM (C19) or purified IgG as control overnight at 4°C. DNA pellets were resuspended in 100 µl of TE.

**Real-time PCR of ChIP DNA.** Each sample was amplified using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Courtabeuf, France) according to the manufacturer protocol in a Roche thermocycler. The primers were: ARE I forward 5'-GGTGCATCCAGGGTGATCTA-3', ARE I reverse 5'-AAACCTTCATTCCCCAGGAC-3', ARE II forward 5'-AGGGATCAGGGAGTCTCACA-3', ARE II reverse 5'-GCTAGCACTTGCTGTTCTGC-3', ARE III forward 5'-



GACAACTTGCAAACCTGCTC-3', ARE III reverse 5'-GATCCAGGCTTGCTTACTGT-3', ARE 3' forward 5'-TGGCCTAGAGCCTCAGATGT-3', ARE 3' reverse 3'-TTCCAAGTACAGGGCTCAC-3', BETA forward 5'-TCCTCCTCTTCCTCAATCTCG-3', BETA reverse 5'-AAGGCAACTTTCGGAACGG-3' (MWG). A standard curve of known target DNA was constructed in parallel from which the relative amount of target DNA in the sample was calculated.

**Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).** GST-DBD and GST-NPM were synthesized as described for GST Pull-Down experiment. NPM-HisX6 tag proteins were synthesized using a His-Bind Kit (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer protocol. The oligonucleotides used are the distal AREd of AKR1B7 promoter (5'-TTAAAAGAACATGCTGCTCTAACCG-3') and the LXR $\alpha$  responsive element LXRE3 of AKR1B7 promoter (5'-TTGAAAGGTCATCCAAGATGAACTGG-3').

EMSA experiments were realized as previously described (47). Binding reactions were performed by mixing 200 ng of GST-DBD with 100 to 250 ng of GST or GST-NPM (1000 ng to 2500 ng of NPM-HisX6) and with 0.1 pmol of probe, in the presence or the absence of 100-fold molar excess of unlabeled competitor. When indicated, anti-NPM antibody (C19) was incubated 10 min. before probe addition.

**Quantification and statistical analysis.** Densitometric analysis of AR and PSA protein expression levels were quantified using Quantity-One software (BIORAD). Statistical analyses were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher *t* test. Values (\* *p*<0.01, \*\**p*<0.05).

## Acknowledgments

The authors are very grateful to J-P. Saru, A. de Haze for their technical assistance, A. Bruhat for his pertinent advices for DNA ChIP. This work was supported by grants awarded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université Blaise Pascal (UBP). L. LEOTOING is recipient of a doctoral fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

## References

1. Hsing, A. W., Tsao, L., and Devesa, S. S. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*, 85: 60-67, 2000.
2. Heinlein, C. A. and Chang, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev*, 23: 175-200, 2002.
3. Wang, L., Hsu, C. L., and Chang, C. Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate*, 63: 117-130, 2005.
4. Lemon, B. and Tjian, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, 14: 2551-2569, 2000.
5. Fu, M., Wang, C., Reutens, A. T., Wang, J., Angeletti, R. H., Siconolfi-Baez, L., Ogryzko, V., Avantaggiati, M. L., and Pestell, R. G. p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem*, 275: 20853-20860, 2000.
6. Powell, S. M., Christiaens, V., Voulgaraki, D., Waxman, J., Claessens, F., and Bevan, C. L. Mechanisms of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate. *Endocr Relat Cancer*, 11: 117-130, 2004.
7. Jeong, B. C., Hong, C. Y., Chattopadhyay, S., Park, J. H., Gong, E. Y., Kim, H. J., Chun, S. Y., and Lee, K. Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol Endocrinol*, 18: 13-25, 2004.
8. Hu, Y. C., Yeh, S., Yeh, S. D., Sampson, E. R., Huang, J., Li, P., Hsu, C. L., Ting, H. J., Lin, H. K., Wang, L., Kim, E., Ni, J., and Chang, C. Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer. *J Biol Chem*, 279: 33438-33446, 2004.
9. Szebeni, A. and Olson, M. O. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*, 8: 905-912, 1999.
10. Szebeni, A., Herrera, J. E., and Olson, M. O. Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry*, 34: 8037-8042, 1995.
11. Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., and Nagata, K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett*, 506: 272-276, 2001.
12. Swaminathan, V., Kishore, A. H., Febitha, K. K., and Kundu, T. K. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol*, 25: 7534-7545, 2005.
13. Inouye, C. J. and Seto, E. Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem*, 269: 6506-6510, 1994.
14. Weng, J. J. and Yung, B. Y. Nucleophosmin/B23 regulates PCNA promoter through YY1. *Biochem Biophys Res Commun*, 335: 826-831, 2005.
15. Mai, R. T., Yeh, T. S., Kao, C. F., Sun, S. K., Huang, H. H., and Wu Lee, Y. H. Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to



- relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression. *Oncogene*, 25: 448-462, 2006.
16. Colombo, E., Marine, J. C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P. G. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*, 4: 529-533, 2002.
  17. Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., and Laiho, M. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*, 5: 465-475, 2004.
  18. Maiguel, D. A., Jones, L., Chakravarty, D., Yang, C., and Carrier, F. Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol*, 24: 3703-3711, 2004.
  19. Li, J., Zhang, X., Sejas, D. P., and Pang, Q. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leuk Res*, 29: 1415-1423, 2005.
  20. Dhar, S. K., Lynn, B. C., Daosukho, C., and St Clair, D. K. Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J Biol Chem*, 279: 28209-28219, 2004.
  21. Burnstein, K. L. Regulation of androgen receptor levels: implications for prostate cancer progression and therapy. *J Cell Biochem*, 95: 657-669, 2005.
  22. Chatterjee, B. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem*, 253: 89-101, 2003.
  23. Bocker, T., Bittinger, A., Wieland, W., Buettner, R., Fauser, G., Hofstaedter, F., and Ruschoff, J. In vitro and ex vivo expression of nucleolar proteins B23 and p120 in benign and malignant epithelial lesions of the prostate. *Mod Pathol*, 8: 226-231, 1995.
  24. Hingorani, K., Szebeni, A., and Olson, M. O. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem*, 275: 24451-24457, 2000.
  25. Maki, C. G., Huibregtse, J. M., and Howley, P. M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res*, 56: 2649-2654, 1996.
  26. Brachmann, S. M., Ueki, K., Engelman, J. A., Kahn, R. C., and Cantley, L. C. Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol Cell Biol*, 25: 1596-1607, 2005.
  27. Yeung, F., Li, X., Ellett, J., Trapman, J., Kao, C., and Chung, L. W. Regions of prostate-specific antigen (PSA) promoter confer androgen-independent expression of PSA in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 275: 40846-40855, 2000.
  28. Savkur, R. S. and Olson, M. O. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*, 26: 4508-4515, 1998.
  29. Fabre, S., Manin, M., Pailhoux, E., Veyssiere, G., and Jean, C. Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase-like protein specific to the mouse vas deferens. *J Biol Chem*, 269: 5857-5864, 1994.
  30. Kim, J., Jia, L., Tilley, W. D., and Coetzee, G. A. Dynamic methylation of histone H3 at lysine 4 in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Nucleic Acids Res*, 31: 6741-6747, 2003.
  31. Tawfic, S., Goueli, S. A., Olson, M. O., and Ahmed, K. Androgenic regulation of the expression and phosphorylation of prostatic nucleolar protein B23. *Cell Mol Biol Res*, 39: 43-51, 1993.
  32. Tawfic, S., Olson, M. O., and Ahmed, K. Role of protein phosphorylation in post-translational regulation of protein B23 during programmed cell death in the prostate gland. *J Biol Chem*, 270: 21009-21015, 1995.
  33. Kondo, T., Minamino, N., Nagamura-Inoue, T., Matsumoto, M., Taniguchi, T., and Tanaka, N. Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene*, 15: 1275-1281, 1997.
  34. Shatkina, L., Mink, S., Rogatsch, H., Klocker, H., Langer, G., Nestl, A., and Cato, A. C. The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol*, 23: 7189-7197, 2003.
  35. Kang, Z., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, 18: 2633-2648, 2004.
  36. Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., and Nigg, E. A. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56: 379-390, 1989.
  37. Valdez, B. C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y., Chan, P. K., and Busch, H. Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23. *J Biol Chem*, 269: 23776-23783, 1994.
  38. Szebeni, A., Mehrotra, B., Baumann, A., Adam, S. A., Wingfield, P. T., and Olson, M. O. Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry*, 36: 3941-3949, 1997.
  39. Takemura, M., Ohoka, F., Perpelescu, M., Ogawa, M., Matsushita, H., Takaba, T., Akiyama, T., Umekawa, H., Furuichi, Y., Cook, P. R., and Yoshida, S. Phosphorylation-dependent migration of retinoblastoma protein into the nucleolus triggered by binding to nucleophosmin/B23. *Exp Cell Res*, 276: 233-241, 2002.



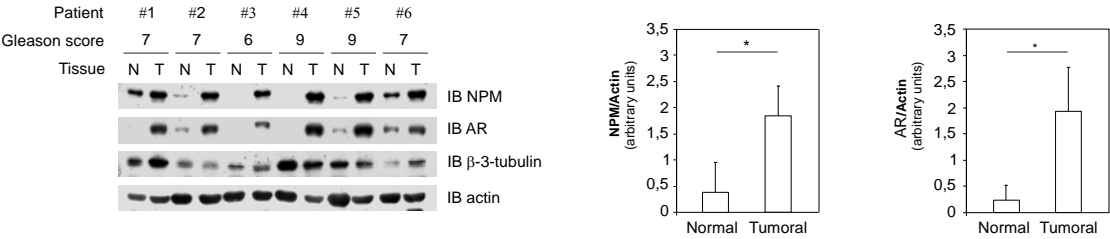
40. Szebeni, A., Hingorani, K., Negi, S., and Olson, M. O. Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23. *J Biol Chem*, 278: 9107-9115, 2003.
41. Chan, W. Y., Liu, Q. R., Borjigin, J., Busch, H., Rennert, O. M., Tease, L. A., and Chan, P. K. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry*, 28: 1033-1039, 1989.
42. Lim, S. O., Park, S. J., Kim, W., Park, S. G., Kim, H. J., Kim, Y. I., Sohn, T. S., Noh, J. H., and Jung, G. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 291: 1031-1037, 2002.
43. Nozawa, Y., Van Belzen, N., Van der Made, A. C., Dinjens, W. N., and Bosman, F. T. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol*, 178: 48-52, 1996.
44. Hsu, C. Y. and Yung, B. Y. Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncogene*, 16: 915-923, 1998.
45. Subong, E. N., Shue, M. J., Epstein, J. I., Briggman, J. V., Chan, P. K., and Partin, A. W. Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate*, 39: 298-304, 1999.
46. Baron, S., Manin, M., Beaudoin, C., Leotoing, L., Communal, Y., Veyssiere, G., and Morel, L. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem*, 279: 14579-14586, 2004.
47. Darne, C. H., Morel, L., Claessens, F., Manin, M., Fabre, S., Veyssiere, G., Rombauts, W., and Jean, C. L. Ubiquitous transcription factors NF1 and Sp1 are involved in the androgen activation of the mouse vas deferens protein promoter. *Mol Cell Endocrinol*, 132: 13-23, 1997.



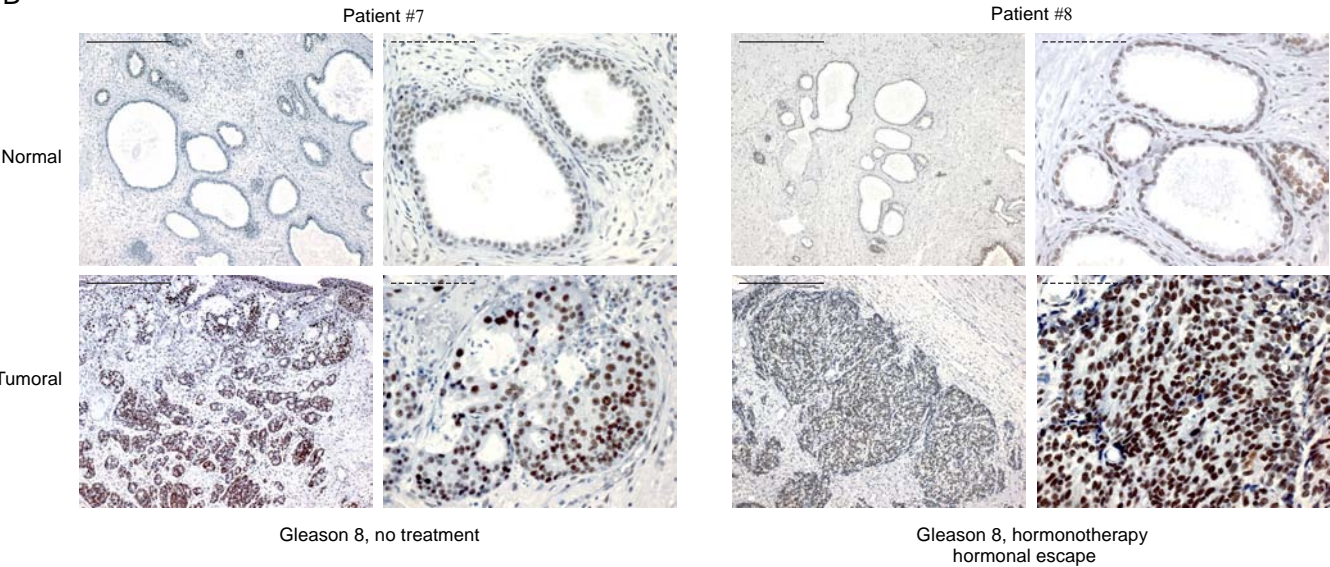


Figure 1

A



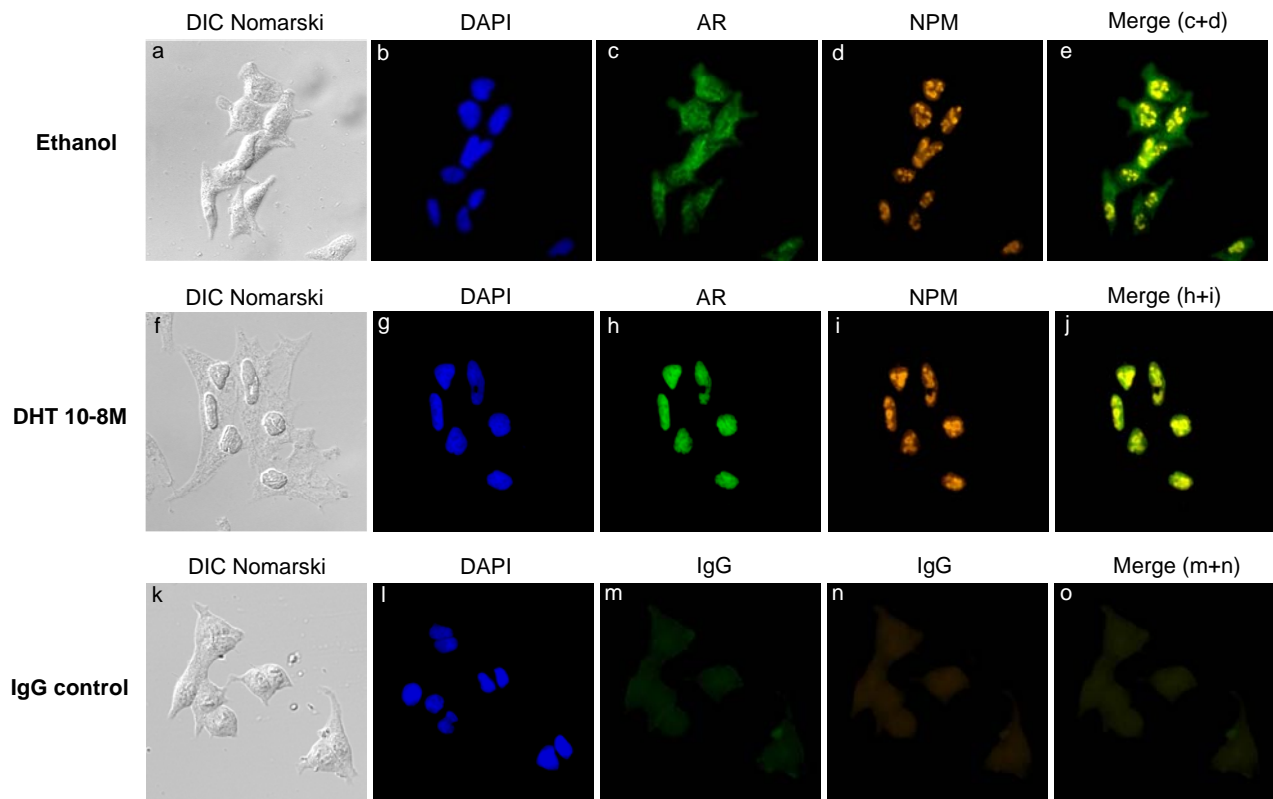
B



**Figure 1 : NPM is over-expressed in prostate cancer biopsies. A.** AR and NPM present a similar pattern of over-accumulation in prostate cancer tissues. Micro-biopsies from normal (N) and adjacent tumoral (T) tissues were realized on six different patients after radical prostatectomy and then AR and NPM levels were analysed using western-blotting. Histograms show the band quantification reported to the actin level (\*  $p<0.01$ ). The  $\beta$ -3-tubulin is used as a marker of the epithelial compartment. **B.** NPM immunostaining in normal and adjacent tumoral tissues. Paraffin-embedded sections of tumoral prostates were immunostained with NPM. Full scale bars correspond to 400  $\mu$ m and hatched scale bars to 100  $\mu$ m.



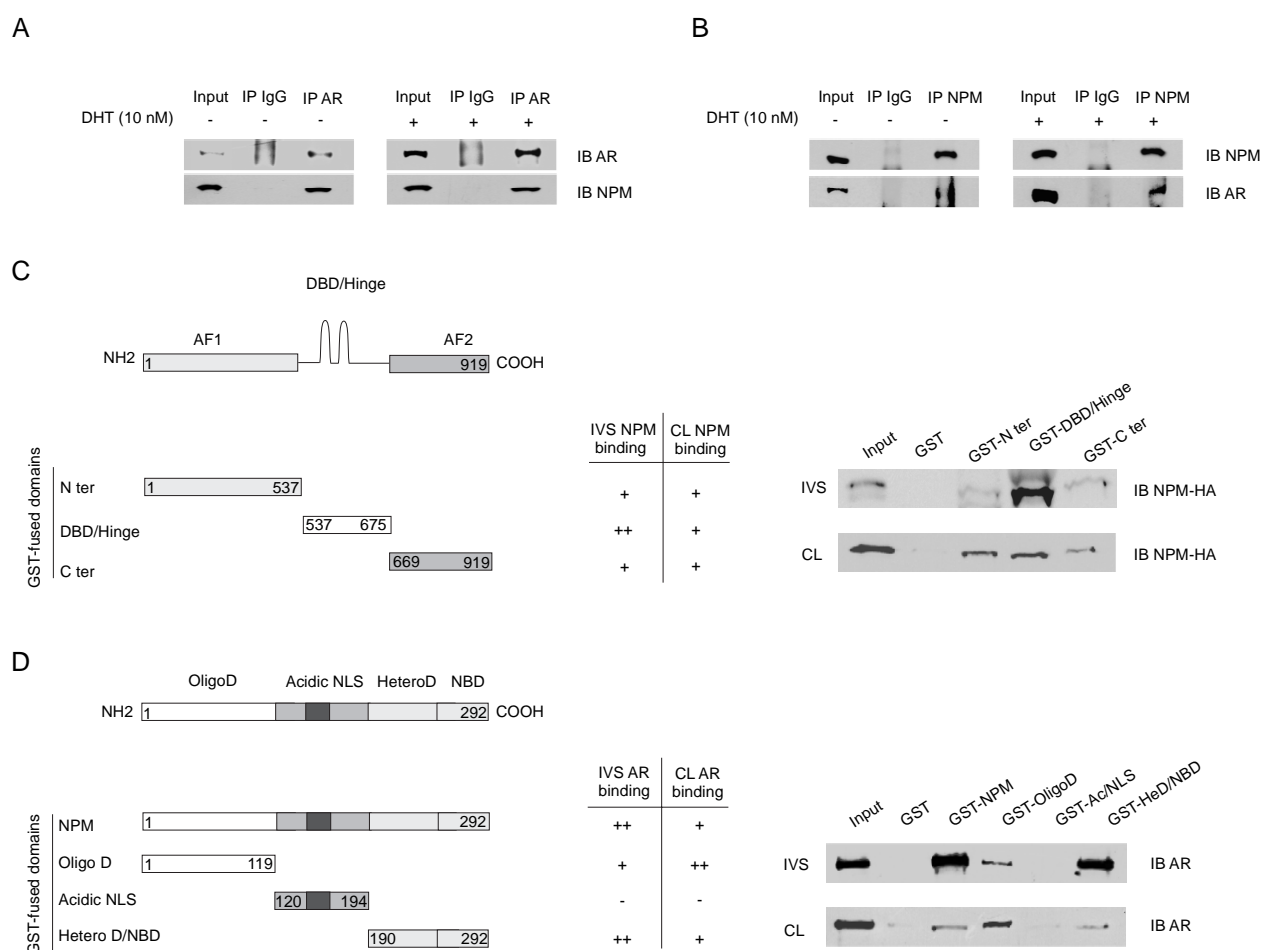
Figure 2



**Figure 2 : AR and NPM are co-localized in the nucleus of LNCaP cells.** LNCaP cells were cultured in the absence or in the presence of 10 nM DHT for 24 hours, fixed in paraformaldehyde solution, permeabilized and assayed for immunofluorescence. The cell shapes were visualized with DIC Nomarski (a,f,k), the nuclei were stained with DAPI (b,g,l), AR (c,h) and NPM (d,i) were stained with specific antibodies as indicated in Methods; the merge image is shown in e and j. Staining with control IgG and secondary antibodies corresponding to those used for AR and NPM are shown in m and n respectively and the merge is represented in o.



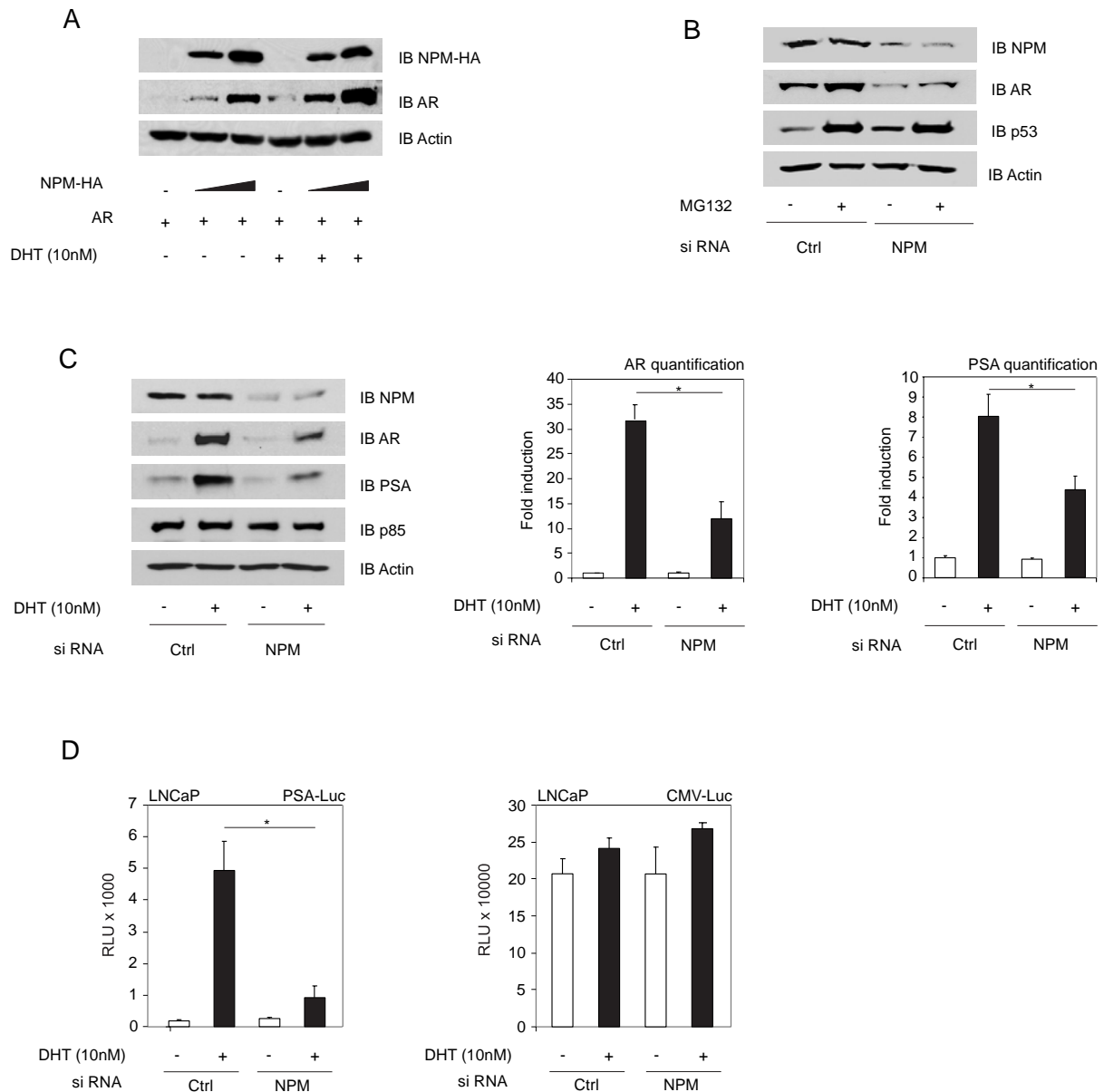
Figure 3



**Figure 3 : The androgen receptor physically interacts with nucleophosmin in prostate cancer cells. A.** Androgen receptor immunoprecipitation. LNCaP cells were cultured for 36 hours in the absence or in the presence of 10nM DHT. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-AR (IP AR) or IgG (IP IgG) as a control and the immune complexes were analysed by western blotting with anti-AR and anti-NPM antibodies. **B.** Nucleophosmin immunoprecipitation. Using the same LNCaP cell lysates, proteins were immunoprecipitated with anti-NPM (IP NPM) or IgG (IP IgG) and analysed as described above. **C and D** Mapping of the AR and NPM interaction domains. HA-tagged NPM and AR were obtained either by in-vitro synthesis (IVS) or from transfected PC3 cells (CL). In C HA-tagged NPM was subjected to in-vitro pull-down assay against N terminal (N ter), DNA Binding Domain/Hinge region (DBD/Hinge) and C terminal (C ter) domains of AR fused to GST. In D, AR was subjected to in-vitro pull-down assay against full length (NPM), Oligomerization-Domain (OligoD), Acidic/Nuclear Localisation Signal (Ac/NLS) domain and Heterodimerization-Domain/Nuclear Binding Domain (HeteroD/NBD) of NPM fused to GST. The bound NPM-HA or AR complexes were analysed by western blotting with an anti-HA or anti-AR antibodies. In A, B, C and D a fraction (1/5) of the proteins used in the binding reactions was loaded as input and in C and D, GST alone was used as a negative control. The equal loading of GST fusion proteins was controlled with S-Ponceau (not shown).



Figure 4

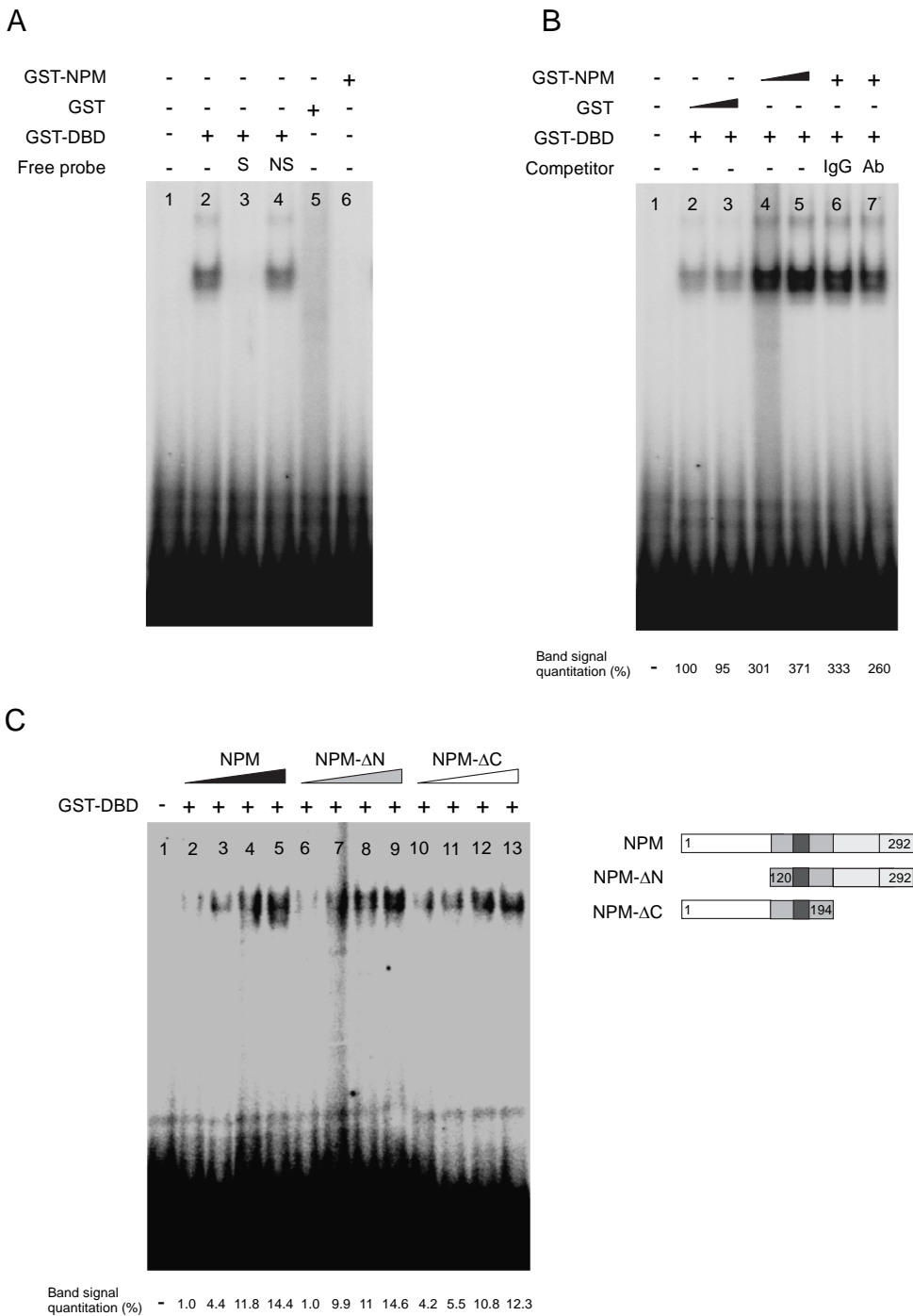


**Figure 4 : Nucleophosmin regulates AR stability and transcriptional activity.** Cell lysates were analysed by western blotting with indicated antibodies. Actin was used as a loading control. **A.** Nucleophosmin over-expression increases androgen receptor accumulation. PC3 cells were co-transfected with pSG5-hAR either alone or with increasing doses of NPM-HA and cultured with or without 10 nM DHT for 48 hours. **B.** AR down-regulation by NPM siRNA is not dependent on the proteasomal pathway. LNCaP cells were transfected with 100 nM control siRNA or specific NPM siRNA, treated for 36 hours with or without 10nM DHT, then treated without or with 50 M MG132 for 6 additional hours. p53 was used to check efficiency of the proteasome inhibition. The data shown are representative of at least three independent experiments. **C.** NPM siRNA down-regulates endogenous AR and PSA levels. LNCaP cells were transfected as described in B. The histograms show the densitometric analysis of AR and PSA protein expression levels (\*  $p<0.01$ ). **D.** Nucleophosmin regulates AR transcriptional activities. LNCaP cells were co-transfected with 100 nM control siRNA or specific NPM siRNA and with either a PSA-Luc reporter plasmid containing the 5.8 kb fragment of the PSA promoter or a constitutive CMV-Luc reporter as a control. The cells were then treated for 36 hours with or without 10nM DHT. Efficiency of NPM siRNA was checked using western-blotting. NPM effect on androgen-regulated promoter activity was evaluated by measuring the luciferase activity (\*  $p<0.01$ ). The data shown are representative of at least three independent triplicate experiments.





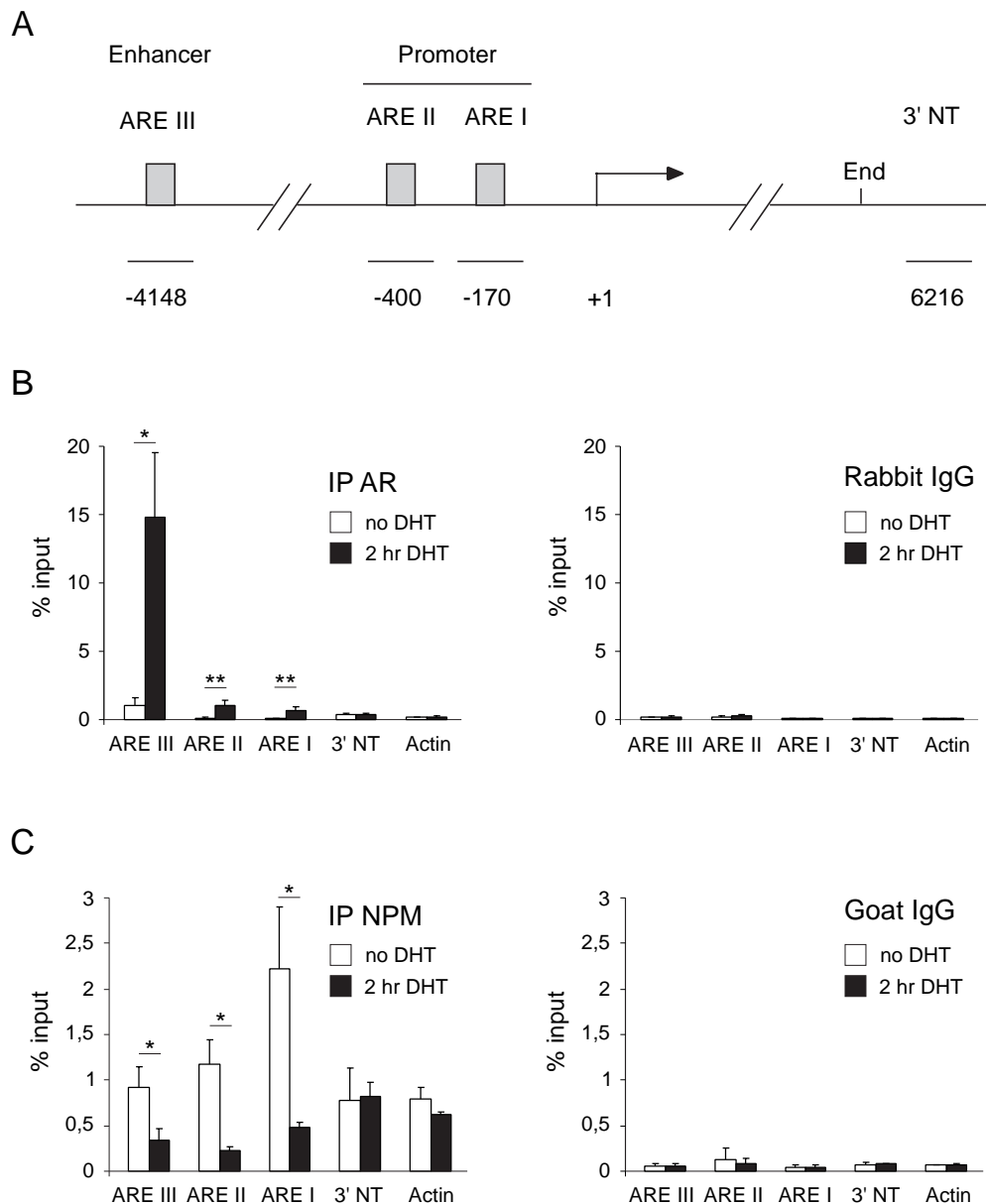
Figure 5



**Figure 5 : Nucleophosmin increases DBD binding activity of AR.** The effect of NPM on the binding properties of GST-DBD was evaluated by gel-shift experiment. **A.** The GST-AR DBD fusion protein binds specifically to an androgen response element. The <sup>32</sup>P labelled double stranded oligonucleotide probe corresponding to the AREd of AKR1B7 promoter was incubated with GST-AR DBD fusion protein or GST alone or GST-NPM fusion protein. Specificity was checked by adding cold specific (S) or non-specific (NS) oligonucleotide competitors as a 100 fold molar excess. **B.** The nucleophosmin increases the AR DBD binding activity on an ARE. EMSA experiments were realised as in A. When indicated, unspecific IgG (IgG) or specific NPM antibody (Ab) competitors were added to the binding reaction. **C.** Full length NPM and NPM deletion mutants have the same effects on AR DNA binding activity. The <sup>32</sup>P labelled double stranded oligonucleotide probe corresponding to the AREd of AKR1B7 promoter was incubated with GST-DBD fusion protein and with increasing doses of recombinant GST-NPM protein and GST-NPM deletion mutants proteins.



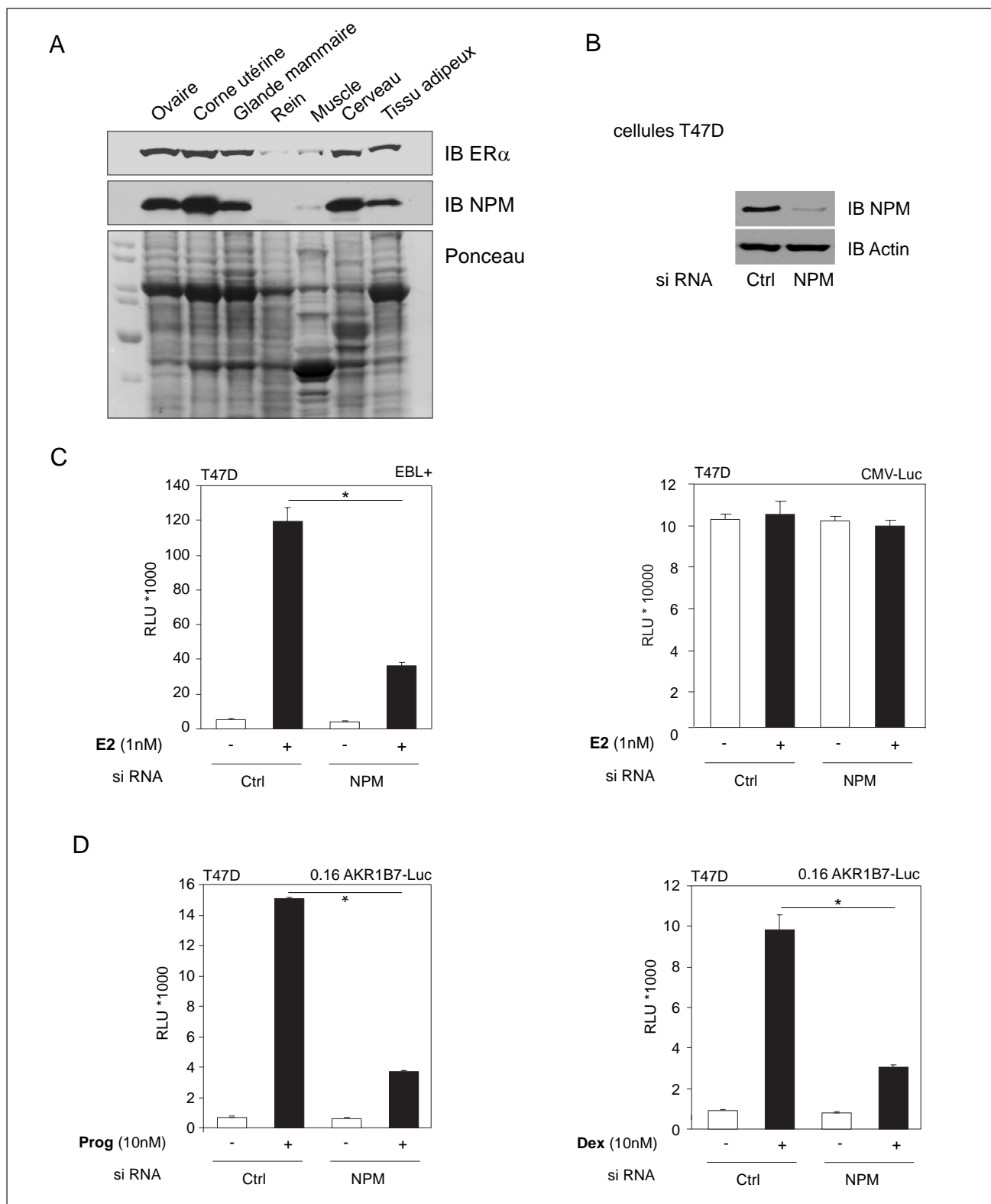
Figure 6



**Figure 6 : *In vivo* recruitment of NPM and AR on the androgen response elements of the PSA promoter. A.** Schematic representation of the three PSA promoter AREs and location of the 3' non-transcribed region (3'NT) used as a control of AR interaction specificity. **B.C.** DNA ChIP experiments showing AR and NPM occupancies on PSA promoter AREs. LNCaP cells were cultured in phenol red-free RPMI medium supplemented with 5% charcoal-stripped foetal bovine serum for 72 hours, then treated with or without 10nM DHT for 2 additional hours. After cross-linking and sonication, AR (**B**) and NPM (**C**) were immunoprecipitated and their occupancy on the different PSA promoter AREs were analysed by amplifying the corresponding regions using quantitative real-time PCR (Left panels). The 3'NT and a fragment on the actin promoter were used to check the specificity of AR and NPM bindings. For each antibody, the corresponding IgG was used as a negative control of immunoprecipitation (right panels). (\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ ). Data are representative of at least two independent IP and three independent PCR amplifications.







**Figure n°45: La nucléophosmine contrôle l'activité des récepteurs nucléaires ER, PR et GR.**

**A.** Profils d'expression protéiques de la nucléophosmine et du récepteur des œstrogènes- $\alpha$  dans différents tissus murins d'origine femelle. **B.** Vérification de l'efficacité d'ARN interférents contre la nucléophosmine dans des cellules de cancer mammaire T47D. Des cellules T47D ont été transfectées avec des ARN interférents (100nM) contre la GFP (ctrl) ou la nucléophosmine (NPM) et l'accumulation de NPM a été mesurée par western-blot. **C.** La nucléophosmine régule l'activité transcriptionnelle du récepteur des œstrogènes. Des cellules T47D ont été transfectées avec des ARN interférence (100nM) contre la nucléophosmine ou contre la GFP avec un plasmide rapporteur EBL+ (ERE- $\beta$ -2-microglobuline-luciférase; panneau de gauche) ou un plasmide d'expression constitutif CMV-Luc comme contrôle (panneau de droite). Les cellules ont été traitées avec 1nM d'estradiol durant 36 heures et l'effet des ARN interférence sur l'activité des rapporteurs a été évaluée par la mesure de l'activité luciférase. **D.** La nucléophosmine régule l'activité transcriptionnelle du récepteur de la progestérone-A et des glucocorticoïdes. Les cellules T47D ont été transfectées comme précédemment avec un rapporteur luciférase dirigé par le promoteur du gène *AKR1B7* et 75ng de plasmide codant pour GR et PR-A et traitées avec 10 nM de progestérone ou de dexaméthasone durant 36 heures.

### **III. La nucléophosmine contrôle l'activité des récepteurs nucléaires ER, PR et GR.**

Les résultats obtenus précédemment mettent en évidence :

- Une interaction *in-vivo* entre la nucléophosmine et le récepteur des androgènes. Cette interaction est augmentée lorsque les cellules sont prolifératives.
- Un profil similaire d'expression protéique tissulaire et cellulaire de ces deux protéines.
- Un contrôle de l'activité du récepteur des androgènes par la nucléophosmine dans des cellules tumorales de la prostate.

Aux vues de ces résultats, il semblait intéressant d'étudier un rôle éventuel de la nucléophosmine à un niveau plus large sur le contrôle de l'activité d'autres récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes. Sont présentés ici quelques résultats préliminaires concernant le récepteur des œstrogènes, de la progestérone et des glucocorticoïdes.

Alors que le récepteur des androgènes est impliqué dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus mâles, celui des œstrogènes présente des activités semblables au niveau des tissus femelles, et son activité est également importante dans la physiologie prostatique. Aussi, dans un premier temps nous avons étudié les profils d'expression protéiques de la nucléophosmine et l'isoforme  $\alpha$  du récepteur des œstrogènes dans différents tissus murins d'origine femelle. Une souris adulte âgée de 15 semaines a été sacrifiée, plusieurs de ses organes ont été prélevés, les tissus broyés, les protéines extraites et dosées. L'accumulation du récepteur  $\alpha$  des œstrogènes et de la nucléophosmine a été évaluée par western-blot. Le rouge ponceau est utilisé comme témoin de l'égalité des dépôts (*figure n°45.A*). Les protéines ER- $\alpha$  et NPM présentent des profils d'accumulation identiques au niveau des tissus étudiés avec notamment des niveaux élevés dans l'ovaire, les cornes utérines, la glande mammaire mais aussi le cerveau et le tissu adipeux. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister une coopération entre ces deux protéines. Nous avons alors étudié quel effet pouvait avoir une diminution du niveau d'accumulation de la nucléophosmine sur l'activité transcriptionnelle du récepteur des œstrogènes. Pour ce faire, des cellules T47D dérivées de cancer mammaire et exprimant le récepteur des œstrogènes (isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ ) ont été transfectées avec des ARN





interférents dirigés contre la nucléophosmine; leur efficacité est présentée dans la **figure n°45.B**. Alors que l'activité du rapporteur luciférase ERE- $\beta$ -2-microglobuline-Luc (EBL+) est fortement induite en réponse à l'estradiol (1nM) dans les cellules contrôles, cette activité est diminuée de 2/3 dans les cellules qui n'expriment que de très faibles niveaux de NPM. Les niveaux de base non-induits sont identiques (**figure n°45.C**) (ERE : *estrogen response element*). Cet effet n'est pourtant pas le résultat d'un mécanisme général sur la transcription ou la traduction des protéines puisque la diminution de l'accumulation de la nucléophosmine n'affecte pas l'activité luciférase d'un rapporteur dirigé par un promoteur constitutif CMV-Luc.

Ainsi, nous pouvons faire un parallèle entre le récepteur des androgènes et celui des œstrogènes en ce qui concerne la régulation de leur activité par la nucléophosmine et leur niveaux d'accumulation respectifs.

Nous avons également étudié l'implication de la nucléophosmine sur l'activité des récepteurs stéroïdes PR-A et GR dans les mêmes cellules T47D (**figure n°45.D**). Le plasmide rapporteur utilisé correspond au gène de la luciférase dirigé par les 160 premières bases du promoteur du gène AKR1B7 régulé par la progestérone et les glucocorticoïdes. Les vecteurs d'expression codant pour PR-A et GR ont été co-transfectés. Alors que l'induction de l'activité luciférase est forte en réponse à la progestérone et à la dexaméthasone dans les cellules témoins, elle est diminuée de 75 à 70% respectivement dans les cellules qui n'expriment que très peu la nucléophosmine, et les niveaux de base restent inchangés.

Ces résultats préliminaires laissent supposer que la nucléophosmine pourrait se comporter comme un co-régulateur général des récepteurs nucléaires stéroïdiens, nécessaire à leur activité transactivatrice. D'autres études seront nécessaires pour préciser ses fonctions cellulaires, approfondir son rôle sur la signalisation androgénique et définir s'il s'agit d'un mécanisme d'action général ou spécifique à chacun des récepteurs nucléaires.



\*\*\*\*\*

## *Discussion, perspectives*

\*\*\*\*\*



L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit présente l'identification de la nucléophosmine en tant que nouveau partenaire du récepteur des androgènes dont l'affinité à celui-ci est modulée en fonction de l'état cellulaire. Il met de plus en évidence une corrélation entre la représentation de ces deux protéines au niveau des tissus dont la physiologie est majoritairement dépendante des androgènes. L'interaction fonctionnelle entre les deux partenaires a été étudiée dans le contexte de la pathologie prostatique et souligne une régulation positive de l'activité du récepteur des androgènes par la nucléophosmine. Enfin, nous faisons l'hypothèse que la dérégulation observée du niveau d'expression de NPM dans le tissu tumoral pourrait être, par l'intermédiaire de AR, un événement qui participe à la mise en place et/ou à la progression de l'état pathologique.

## **I. Quel est l'intérêt de rechercher de nouveaux partenaires du récepteur des androgènes ?**

Depuis que le récepteur des androgènes a été cloné et caractérisé, de très nombreuses études ont porté sur la recherche de ses partenaires d'interaction. Les techniques utilisées pour ces études étaient souvent réalisées par double-hybride chez la levure en criblant des banques d'ADNc avec certaines portions du récepteur des androgènes, par co-immunoprécipitation des complexes associés à AR dans des extraits cellulaires ou encore par tests d'interaction de protéines déjà connues pour interagir avec et contrôler d'autres récepteurs nucléaires. Une fois les protéines identifiées, ont suivi les essais pour caractériser le rôle des interactions. Néanmoins, ces cribles ont très souvent été réalisés en contexte tumoral, dans le souci de pouvoir associer les interacteurs identifiés à la physiopathologie.

La méthodologie que nous avons utilisée, à savoir un crible différentiel de protéines interagissant avec le récepteur des androgènes dans des cellules saines en prolifération ou différenciées, s'inscrit dans la problématique du contrôle de son activité en fonction de l'état cellulaire. Cet aspect de la recherche se base sur le constat de la perte de différenciation des cellules épithéliales et de leur prolifération anarchique dans le cancer de la prostate. Dans la synthèse bibliographique, nous avons pu nous rendre compte que les androgènes, par l'intermédiaire de leur récepteur et de ses co-régulateurs, étaient largement impliqués dans cette pathologie. Aussi, il nous a semblé intéressant d'identifier certains des partenaires de AR par une approche sans a priori, dans un modèle cellulaire androgéno-sensible reproduisant



les états de prolifération et de différenciation cellulaire. De plus, cette recherche a pris le contre-pied des études réalisées en contexte tumoral, puisque nous avons choisi de cerner dans un premier temps, la régulation de AR par des protéines d'interaction lorsque les équilibres protéiques ne sont pas perturbés, pour ensuite étudier en contexte pathologique le maintien ou non de ces équilibres.

Le protocole expérimental prévu au départ consistait en plusieurs chromatographies d'affinité impliquant les différents domaines du récepteur des androgènes à savoir la portion N-terminale (domaine de transactivation A/B), la région centrale (domaine de liaison à l'ADN C et région charnière D) et la portion C-terminale (domaine de liaison du ligand E/F) fusionnées à la protéine GST (*glutathion S-transférase*). La réalisation d'une chromatographie à grande échelle (200 micro-grammes de protéine de fusion contre 5 milli-grammes d'extraits cellulaires) avec le récepteur des androgènes pleine longueur est en effet très délicate en raison d'une dégradation importante des protéines chimériques de haut poids moléculaire ; non seulement cette dégradation affecte la qualité de l'affinité des protéines mais de plus, les fragments peptidiques générés auraient rendu difficile l'analyse des gels d'électrophorèse bidimensionnelle. Notre choix s'est porté dans un premier temps sur le domaine C-terminal de AR et nous a permis d'identifier la nucléophosmine/B23.1 comme protéine interagissant avec le récepteur dans des extraits de cellules épithéliales en condition proliférative. Il faut noter qu'une expérience de chromatographie d'affinité impliquant le domaine central de AR suivi d'un séquençage MALDI-TOF a également permis d'identifier la nucléophosmine et dans la même condition de cellules prolifératives.

Ainsi, ce travail fait état d'un nouveau partenaire du récepteur des androgènes et relate pour la première fois l'interaction de la nucléophosmine avec un récepteur nucléaire.

De plus, cette approche nous a aussi permis d'identifier un autre nouveau partenaire de AR : la protéine SET/TAF-1 $\beta$  (*template activating factor 1 $\beta$* ). Cette protéine est ainsi dénommée pour sa capacité à stimuler la réplication de l'ADN adénoviral (Matsumoto et al., 1993). TAF-I appartient à une famille de protéines nucléaires à domaine acide largement impliquée dans la régulation de la transcription. D'une part TAF-I possède une activité d'histone chaperonne grâce à laquelle elle remodèle la chromatine et active la transcription (Okuwaki and Nagata, 1998). D'autre part, TAF-I appartient au complexe INHAT (*inhibitor of acetyltransferase*). Ce dernier, par l'intermédiaire de TAF-I inhibe l'acétylation des histones par p300 et pCAF et par là même la transcription (Seo et al., 2001). De plus, cette activité se traduit par une inhibition de la déméthylation de l'ADN et ainsi un verrouillage plus important de la chromatine (Cervoni et al., 2002). Un élément intéressant est que cette protéine régule





également l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire ER- $\alpha$  en empêchant son acétylation par p300 (Loven et al., 2003). Les auteurs ont aussi mis en évidence son interaction avec PR-B, TR $\beta$  et RXR $\alpha$ . Nos tests préliminaires confirment qu'elle interagit avec AR *in-vitro* et *in-vivo*. Il faudra ensuite développer les essais fonctionnels.

## II. Quelle relation lie AR et NPM ?

Un résultat qui conforte une relation étroite entre le récepteur des androgènes et la nucléophosmine est la similarité de leurs profils d'expression protéiques dans les différents tissus murins mâles étudiés. En effet, à l'analyse de ces profils, on se rend compte que la nucléophosmine est majoritairement exprimée dans les tissus dépendants des androgènes. Ce sont principalement les tissus du tractus génital mâle, mais aussi le cerveau et dans une moindre mesure le tissu adipeux. Cette colocalisation pourrait signifier l'existence d'une interdépendance de ces deux protéines pour le contrôle des fonctions régulées par les androgènes.

Il est possible d'envisager dans un premier temps que la nucléophosmine soit régulée par les androgènes. Des études de Tawfic et coll. rapportent une régulation du niveau de phosphorylation et de l'accumulation de la nucléophosmine par les androgènes (Tawfic et al., 1993; Tawfic et al., 1995). Au niveau de la prostate ventrale de rat, la castration des animaux induit une diminution rapide du niveau de phosphorylation de NPM et de son niveau d'accumulation. En revanche les messagers sont beaucoup plus stables et détectables plus longtemps après la castration. En fait, la nucléophosmine est phosphorylée par la protéine kinase CK2 (*casein kinase 2*) dont l'activité est elle-même régulée par les androgènes. La diminution rapide du niveau de phosphorylation de NPM après privation androgénique serait ainsi plus le résultat d'une perte de l'activité de CK2 qu'une diminution du niveau d'accumulation de NPM. Ainsi, les auteurs émettent l'hypothèse que la phosphorylation de NPM par la CK2 protégerait la protéine d'une dégradation protéolytique. Après castration, l'apport d'androgènes chez les rats se traduit au niveau de la prostate ventrale par une récupération de l'état de phosphorylation de NPM et de son niveau d'accumulation qui précède la reprise de prolifération cellulaire. Ainsi, cette régulation de NPM par les androgènes correspondrait aux événements précoces de la croissance prostatique en réponse aux androgènes. Cet effet serait spécifique de la prostate puisqu'il n'a pas été observé au niveau d'autres organes comme le foie. Dans notre étude sur les cellules épithéliales nous



n'avons pas mis en évidence de variations d'accumulation protéique ou de messagers de NPM en réponse aux androgènes. De même, une telle modulation du niveau d'accumulation de NPM n'a pas non plus été détectée dans les cellules LNCaP pourtant d'origine prostatique. La nature des échantillons (organe entier ou cellules, tissu sain ou tumoral) peut expliquer en partie ces différences de résultats.

Il est intéressant de constater que la similarité des profils d'accumulation de NPM et AR peut également s'appliquer au récepteur nucléaire des œstrogènes ER- $\alpha$ , acteur majeur de la physiologie hormonale chez la femelle. En effet, il a été montré une régulation positive de la nucléophosmine par les œstrogènes dans des cellules de cancer du sein MCF-7 (Skaar et al., 1998). De plus, les auteurs impliquent la nucléophosmine dans la croissance œstrogéno-indépendante des cellules mammaires cancéreuses.

L'ensemble de ces résultats et observations permet de penser qu'il existe une corrélation fonctionnelle entre la nucléophosmine et certains récepteurs aux hormones stéroïdes. Dans la suite de notre étude et pour être cohérents avec nos objectifs, nous avons étudié le rôle de la nucléophosmine sur l'activité de différents récepteurs nucléaires aux stéroïdes et principalement sur celle de AR dans le contexte de la pathologie prostatique.

### **III. Comment interpréter le fait que la nucléophosmine interagisse préférentiellement avec AR dans des cellules en état de prolifération ?**

Nous aurions tout d'abord pu penser que cette différence était due au fait que les cellules VDEC prolifératives expriment beaucoup plus la nucléophosmine que les cellules différenciées. En effet, on observe une diminution progressive du niveau de NPM lorsque les cellules épithéliales se différencient. Une telle diminution a également été mise en évidence dans des cellules de leucémie HL60 en réponse à de faibles doses d'acide rétinoïque (Hsu and Yung, 1998). Cependant, les expériences de chromatographie ont été réalisées avec des extraits nucléaires de cellules. Or, au niveau nucléaire la quantité de nucléophosmine est identique pour les deux états cellulaires. En effet, la différence observée au niveau total provient de l'enrichissement polysomal et cytosolique dans les cellules en prolifération. De même, cette interaction préférentielle a été confirmée par une chromatographie d'affinité de type GST-pull down avec le récepteur entier contre les extraits nucléaires préparés à partir des deux conditions cellulaires, et suivie d'une analyse en western-blot avec un anticorps anti-nucléophosmine. Ce résultat laisse donc supposer que le récepteur des androgènes et la



nucléophosmine se retrouvent associés au niveau nucléaire en un complexe multi protéique et que leur affinité mutuelle est modulée par d'autres partenaires. De plus, l'état de phosphorylation de NPM pourrait aussi participer à cette interaction différentielle puisqu'il régule son affinité pour divers substrats (Szebeni et al., 2003). Ce différentiel d'interaction s'inscrit dans notre problématique du contrôle de l'activité de AR en fonction de l'état cellulaire. Cependant, si l'on considère que la signalisation androgénique est plus active avec la différenciation des cellules épithéliales comme en témoignent l'accumulation plus importante de AR et l'induction de la protéine AKR1B7 en réponse aux androgènes, et que l'on suppose que la nucléophosmine participe à cette activité, cette dernière se comporterait alors plutôt comme un régulateur négatif de AR. Or, les résultats obtenus dans un deuxième temps sur les cellules LNCaP la décrivent au contraire comme un régulateur positif du récepteur. Cette différence pourrait éventuellement s'expliquer par le contexte cellulaire. Dans le modèle VDEC, nous nous trouvons en contexte prolifératif certes, mais non tumoral. Les niveaux d'accumulation de la nucléophosmine sont d'ailleurs beaucoup plus élevés dans les cellules tumorales LNCaP que dans les cellules VDEC en prolifération (de l'ordre du double ou du triple). De plus, il est certain qu'une protéine à elle seule ne peut être responsable de la pleine activité du récepteur et qu'il faut considérer le contexte cellulaire dans sa globalité. Néanmoins, il est difficile de conclure quant au rôle de la nucléophosmine sur AR dans les cellules épithéliales sans avoir réalisé au préalable les tests fonctionnels. Un des problèmes majeurs de cette étude dans les cellules épithéliales réside dans leur très faible efficacité de transfection, en particulier lorsqu'elles sont différenciées. Pour cette raison, les tests d'activité luciférase sont impossibles à réaliser de façon reproductible. De même, les essais de transfection d'ARN interférents contre la nucléophosmine se sont révélés infructueux, bien que d'autres ARNi (siAR) dans ces mêmes cellules soient efficaces. La création de clones stables de cellules épithéliales n'exprimant que très peu la nucléophosmine (vecteur permettant la formation d'ARN interférents en épingles en cheveux) ou au contraire la surexprimant avait été envisagée. Cependant, les précédentes expériences d'obtention de clones stables au laboratoire n'ont pas toujours donné les résultats escomptés en raison d'une très grande variabilité d'expression protéique entre les différents clones. L'utilisation de particules virales permettrait très certainement de palier ce problème de transfection. On pourrait ainsi dans chacun des états, évaluer la fonction de la nucléophosmine sur l'activité du récepteur des androgènes.



#### IV. Comment s'opère le contrôle de NPM sur AR ?

##### A. Contrôle de l'activité transcriptionnelle de AR.

Nos résultats expérimentaux apportent plusieurs arguments en faveur d'un contrôle de NPM sur l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes. Tout d'abord, la diminution du niveau de NPM par ARN interférents se traduit par une très forte baisse de l'activité transactivatrice de AR sur son gène cible endogène (*PSA*) ou exogène (*PSA-Luc*). De plus, les expériences de retardement sur gel montrent que NPM facilite la fixation de AR à ses séquences cibles sur l'ADN. La question est désormais de comprendre comment s'effectue ce contrôle. Nous pouvons imaginer que la nucléophosmine, par son activité chaperonne, permet au récepteur d'adopter une conformation plus efficace pour son recrutement sur les AREs. Néanmoins, ces mêmes résultats indiquent que l'effet de NPM s'opère avant ou au moment de la fixation de AR à l'ADN. En effet, elle n'est pas retrouvée dans le complexe protéine-ADN comme en témoigne l'absence de retard lorsqu'elle est ajoutée à la réaction ou bien qu'un anticorps anti-NPM est lui aussi ajouté. On suppose ainsi, que le récepteur possède une affinité plus importante pour ses AREs que pour NPM. Cette expérience ayant été réalisée *in-vitro*, cela suggère que cette compétition entre NPM et l'ADN, dictée par l'affinité relative de AR à chacun, est déterminante dans ce processus. Toutefois, cela n'exclut pas un contrôle de l'affinité AR-NPM *in-vivo* par le niveau de phosphorylation de cette dernière. En effet, la phosphorylation de NPM par la protéine kinase CK2, au niveau d'une région importante pour son activité chaperonne (sérine 125), module négativement son affinité pour son substrat (citrate synthase, rhodanese, peptide NLS). Si le résultat de l'immunoprécipitation de chromatine est différent de celui que l'on aurait pu attendre (recrutement de NPM sur les AREs en réponse à la DHT), la présence de DHT et par conséquent le recrutement de AR sur les AREs du promoteur *PSA*, s'accompagne d'un profil de recrutement de la nucléophosmine qui est spécifique de ces AREs. Cette dernière est en effet présente non-seulement au niveau des AREs mais aussi sur d'autres régions de l'ADN en absence de DHT (3'-NonTranscrit, promoteur  *$\beta$ -actine*) et seuls les AREs sont libérés lorsque AR s'y fixe en réponse à la DHT. Un élément intéressant à noter est la régulation de la translocation nucléaire, de l'association à la chromatine et de l'activité de la protéine kinase 2 par les androgènes (Ahmed et al., 1993; Guo et al., 1999; Tawfic and Ahmed, 1994). On peut ainsi supposer qu'en réponse à la DHT, AR soit transloqué dans le noyau et interagisse avec la nucléophosmine au niveau des AREs.





NPM participerait alors au remodelage du récepteur pour faciliter sa liaison et son affinité à ses séquences cibles. Par le jeu d'une compétition entre les AREs et NPM pour la liaison à AR, et de la phosphorylation de NPM par la CK2, il y aurait alors dissociation du complexe.

La nucléophosmine pourrait également participer au niveau de l'ADN, au remodelage de la chromatine et au recrutement de co-facteurs du récepteur des androgènes, et ainsi participer à l'initiation de la transcription. En effet, dans des cellules de carcinome hépatique HuH7, la transfection stable de la protéine *core* du virus de l'hépatite C (HCV), résulte en un recrutement de NPM, de p300 et de *core* au niveau d'un élément de fixation du facteur de transcription YY1, sur le propre promoteur de la nucléophosmine (Mai et al., 2006). Cet événement se traduit par une levée de répression induite par la fixation constitutive de YY1, et par une activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur dirigé par le promoteur de NPM. Dans ces mêmes cellules, alors que les surexpressions individuelles de NPM ou de p300 engendrent une augmentation de la transcription du rapporteur, leur surexpression combinée résulte en un effet synergique. Ce résultat souligne la coopération de ces deux protéines dans la régulation transcriptionnelle. De plus, un autre rapport établit une corrélation entre l'activité histone chaperonne de NPM et son acétylation par p300 (Swaminathan et al., 2005). La nucléophosmine possède la capacité d'interagir avec les histones et de les assembler sur de l'ADN relâché pour former des nucléosomes. L'acétylation directe de NPM par p300 (au niveau de six résidus lysines) résulte en une plus grande affinité de NPM pour les histones acétylées, et par une réorganisation de la structure chromatinienne. Les auteurs montrent par des essais de transcription in-vitro sur une matrice chromatinienne, que l'acétylation de NPM par p300 induit une activation de la transcription. Ainsi, on pourrait supposer que la nucléophosmine participe à la réorganisation de la chromatine au niveau des éléments de réponse aux androgènes. En effet, la protéine p300 est recrutée au niveau du promoteur et de l'*enhancer* du gène PSA en réponse à la DHT (Kang et al., 2004b). Suite à une stimulation par les androgènes, le récepteur des androgènes est recruté au niveau de ses AREs, et interagit avec ses co-facteurs dont p300. Par son activité HAT, ce dernier pourrait alors acétyler NPM et/ou les histones. Une fois activée, la nucléophosmine initierait une réorganisation de la structure chromatinienne spécifiquement au niveau des régions AREs, ce qui faciliterait le recrutement d'autres co-facteurs ou encore le glissement de l'ARN POLII vers le site d'initiation de la transcription (comme proposé dans le schéma de Wang et Brown, 2005). On pourrait aussi imaginer qu'une autre fraction de la nucléophosmine interagisse avec AR pour faciliter son transport dans le noyau, ce qui se traduirait par une plus grande disponibilité



de AR au niveau du noyau. En effet, NPM est une protéine navette entre le cytoplasme et le noyau, elle possède une affinité de liaison pour les protéines qui contiennent un NLS et sa capacité à transférer ces protéines dans le noyau est positivement régulée par sa phosphorylation par la même protéine kinase CK2 (Szebeni et al., 2003; Szebeni et al., 1997; Yun et al., 2003). Ceci sous-entend que différentes fractions de NPM puissent interagir avec AR et que leur niveau de phosphorylation soit séquentiellement régulé par les androgènes en fonction de leur localisation cellulaire.

#### B. Contrôle du niveau d'accumulation de AR.

L'augmentation du niveau d'accumulation de AR lorsque NPM est surexprimée ou sa diminution lorsque NPM est réprimée par ARNi, peuvent résulter d'effets directs de NPM sur la protéine AR ou indirects par l'intermédiaire de la régulation de l'expression du gène. En effet, la modulation du niveau d'accumulation de AR pourrait s'opérer par :

- une régulation transcriptionnelle puisque le promoteur du gène AR mais aussi le cDNA codant pour AR possèdent des AREs. Ainsi une augmentation de l'activité transactivatrice de AR se traduit par une augmentation de la transcription de son propre gène et de la protéine synthétisée. Toutefois, pour un certain nombre de partenaires de AR, il n'existe pas nécessairement une modulation parallèle de son activité transcriptionnelle et de son niveau d'accumulation (Lin et al., 2004a; Metzger et al., 2005; Zhang et al., 2004).
- une régulation post-transcriptionnelle via le processus d'autorégulation par lequel les androgènes induisent une mobilisation des ARNm de AR vers les polyribosomes favorisant leur traduction.
- une régulation de la stabilité du récepteur des androgènes. Un argument renforçant cette hypothèse est l'accumulation de AR dose dépendante du niveau de NPM dans les cellules PC3 en absence d'hormone. Cependant, il ne semble pas que NPM protège le récepteur d'une dégradation par le protéasome comme en témoignent les expériences réalisées avec l'inhibiteur du protéasome MG132.



Il est toujours difficile de pouvoir dissocier chacun de ces niveaux de régulations. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin d'éclaircir les points d'ombre qui subsistent.

## **V. Quelle place donner à la nucléophosmine dans le cancer de la prostate et les autres cancers ?**

Les résultats de western blot et d'immuno-histologie que nous avons obtenus sur des échantillons de prostates humaines indiquent que la nucléophosmine est plus fortement accumulée dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain. Les échantillons utilisés pour le western blot ont été obtenus à partir de biopsies réalisées après prostatectomie puis dissection et séparations des zones tissulaires saines et tumorales par un urologue (M. Decaussin, LYON). De même, après hybridation, les lames histologiques ont été soumises à l'avis de l'urologue pour clairement identifier les zones saines et tumorales. Le but de ces deux expériences n'était pas de réaliser une étude statistique sur les niveaux d'expression de la nucléophosmine dans les tumeurs prostatiques, mais dans un premier temps de pouvoir établir des corrélations prometteuses avant une étude plus approfondie. Ainsi, on se rend compte que si le niveau de la nucléophosmine dans le tissu sain varie d'un patient à l'autre, il est systématiquement plus élevé dans le tissu tumoral. Cette différence de niveaux inter-patients avait déjà été observée dans une expérience que nous avons réalisée précédemment par immuno-histologie sur un macro-array de tissus prostatiques. L'hybridation des lames est en concordance avec les résultats de western-blot. Néanmoins, son interprétation a été plus délicate en raison même des limites liées à la réalisation de cette technique. Ainsi, sur une même lame il n'est pas toujours possible de trouver des tissus adjacents sains et tumoraux. De même, les hybridations ne sont pas toujours très homogènes. Sur l'ensemble des hybridations qui ont été réalisées et qui étaient interprétables (environ 20 lames), nous avons retrouvé une plus forte intensité de marquage de la nucléophosmine dans le tissu tumoral que dans le tissu sain chez plus de la moitié des patients. Deux études aux résultats contradictoires avaient déjà été réalisées sur la nucléophosmine dans le cancer de la prostate. L'étude la plus ancienne qui avait analysé la nucléophosmine sur différentes coupes d'hyperplasie bénigne de la prostate et de tumeurs prostatiques par immuno-histologie avait conclu que NPM était un marqueur général du nucléole (Bocker et al., 1995). En revanche, Subong et coll. à l'aide d'un anticorps préparé contre les protéines de la matrice nucléaire et qui reconnaît en fait la nucléophosmine,



ont mis en évidence un marquage plus intense de cette dernière dans le tissu tumoral prostatique par rapport au tissu sain (Subong et al., 1999). Nos résultats mettent clairement en évidence une accumulation plus importante de NPM dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons avec notamment des stades plus précoces nous permettrait d'établir ou non une corrélation avec le stade tumoral qu'il nous a été difficile de réaliser de façon définitive avec les informations dont nous disposons.

#### A. La nucléophosmine : un proto-oncogène ?

Une surexpression de la nucléophosmine a également été associée au cancer de la muqueuse colorectale (Nozawa et al., 1996), de l'ovaire (Shields et al., 1997), à celui des cancers gastriques (Tanaka et al., 1992) ou encore aux risques de récurrence et de progression du cancer de la vessie (Tsui et al., 2004). Ainsi, certains arguments bibliographiques laissent entendre que NPM pourrait se comporter comme un proto-oncogène. En effet, un niveau élevé de nucléophosmine est fortement corrélé à la prolifération cellulaire induite par des signaux mitogènes et se traduit par un gain de prolifération et de croissance cellulaire (Kondo et al., 1997). Il faut noter que NPM est une cible transcriptionnelle du proto-oncogène c-myc (Zeller et al., 2001) dont la dérégulation est largement impliquée dans divers cancers (Hoffman et al., 2002; Liao and Dickson, 2000). La nucléophosmine pourrait jouer un rôle d'intermédiaire en favorisant la progression tumorale via ses activités sur la synthèse protéique (Ruggero and Pandolfi, 2003). Au contraire, des fibroblastes embryonnaires dérivés de souris invalidées pour la nucléophosmine présentent un arrêt de croissance et une sénescence précoce (Grisendi et al., 2005). Ce rôle joué par la nucléophosmine sur la prolifération cellulaire pourrait s'expliquer par sa participation active à la biogenèse des ribosomes. La nucléophosmine, par son activité chaperonne et sa capacité à faire la navette entre le nucléole, le noyau et le cytoplasme, fonctionne comme un transporteur des particules préribosomales (Borer et al., 1989; Olson et al., 1986; Szébeni and Olson, 1999; Yu et al., 2006) mais elle participe aussi à la maturation des ARN pré-ribosomaux grâce à son capacité de liaison aux acides nucléiques et son activité ribonucléasique (Herrera et al., 1995; Wang et al., 1994). De plus, elle est associée à une protection des cellules contre l'apoptose. Une surexpression de NPM protège des cellules NIH3T3 de l'apoptose induite par les UV (Wu et al., 2002) ou des cellules de leucémie HL-60 de l'apoptose induite par de fortes concentrations d'acide rétinoïque (Hsu and Yung, 2000). Inversement, des cellules NIH3T3





transformées avec le proto-oncogène c-Ras (*cellular murine sarcoma virus oncogene homolog*) sont beaucoup plus susceptibles à l'apoptose induite par la privation de sérum lorsque le niveau de nucléophosmine a été abaissé par des ARN interférents (Chou and Yung, 2001). L'action anti-apoptotique de la nucléophosmine pourrait passer entre autre par sa capacité à réguler négativement p53 (Mauguel et al., 2004) ou encore le suppresseur de tumeur IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor-1*) qui est un facteur de transcription impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN par une apoptose et un arrêt dans le cycle cellulaire (Kondo et al., 1997) ou bien encore en inhibant la protéine pro-apoptotique PKR (Pang et al., 2003).

## B. La nucléophosmine : un suppresseur de tumeur ?

Si la nucléophosmine semble être impliquée dans certaines pathologies tumorales suite à une surexpression, à l'inverse, elle l'est aussi dans des tumeurs hématopoïétiques par mutation, délétion ou translocation de son gène. Le gène de la nucléophosmine, situé en 5q35, présente de fréquentes translocations avec les gènes ALK (*anaplastic lymphoma kinase*), RAR $\alpha$  et MLF1 (*myelodysplasia/myeloid leukaemia factor 1*) créant ainsi des protéines chimères à activité constitutive et au pouvoir oncogénique responsables de leucémies et de lymphomes (Arber et al., 2003; Morris et al., 1994; Redner et al., 1996). De même la perte partielle ou totale de la région chromosomique contenant la nucléophosmine est également retrouvée chez des patients atteints de MDS (*myelodysplastic syndrome*) (Faderl et al., 2001). Une mutation de la nucléophosmine qui la relocalise au niveau du cytoplasme a été identifiée chez environ 35% de patients souffrant de leucémies myéloïdes sévères (Cazzaniga et al., 2005; Falini et al., 2005). De plus, les souris hétérozygotes invalidées pour la nucléophosmine (NPM-/+ ) présentent les mêmes symptômes hématologiques que des patients atteints de MDS (Grisendi et al., 2005). L'unité entre ces différentes altérations de la nucléophosmine, est qu'elles se traduisent par la perte d'un allèle sur le gène ou de la fonction de la protéine. Si la perte d'une dose de nucléophosmine est associée à une pathologie tumorale, elle se caractérise alors comme un suppresseur de tumeur. C'est en effet l'hypothèse faite par l'équipe de recherche qui a réalisé l'invalidation de la nucléophosmine. Ils démontrent que la nucléophosmine est haplo-insuffisante pour le contrôle de l'intégrité du génome et qu'au fur et à mesure des passages, les fibroblastes embryonnaires hétérozygotes (NPM-/+ ) présentent un avantage de croissance par rapport aux fibroblastes homozygotes (NPM+/+ ). Une explication avancée pour expliquer ce rôle de la nucléophosmine réside dans sa capacité à protéger la protéine p19ARF (*alternative reading frame*) de la dégradation en la séquestrant dans le nucléole (Kuo



et al., 2004). Or, la protéine p19ARF est un inhibiteur de la prolifération cellulaire par des mécanismes dépendants ou non de p53. Ainsi, la perte de la nucléophosmine ou sa relocalisation cytoplasmique entraîneraient une dégradation de la protéine p19ARF qui ne pourrait plus assurer ses fonctions anti-prolifératives. Une étude préliminaire, également basée sur une invalidation de NPM chez des souris, conclue également en un rôle de suppresseur de tumeur de la nucléophosmine (Colombo et al., 2005).

Si l'implication de la nucléophosmine dans la pathologie tumorale est certaine, il est difficile de trancher sur son rôle de proto-oncogène ou au contraire de suppresseur de tumeur. Il est néanmoins indéniable que les anomalies de ses niveaux d'expression engendrent des troubles importants du contrôle de la prolifération cellulaire.

## **VI. Quelle suite donner à ce travail ?**

S'il est certain qu'il existe une relation étroite entre la nucléophosmine et le récepteur des androgènes, plusieurs questions subsistent sur le mode de régulation de AR par NPM et sur la participation de la nucléophosmine dans la carcinogenèse prostatique.

### **A. L'interaction fonctionnelle AR/NPM.**

Un élément clef qui nous permettrait de mieux cerner la fonction de la nucléophosmine serait de déterminer la ou les fractions de NPM qui interagissent avec AR. S'il est vrai que la nucléophosmine est majoritairement localisée dans le nucléole et dans une moindre mesure dans le nucléoplasme, elle peut également faire la navette entre les différents compartiments cellulaires et pourrait ainsi participer aux différentes étapes de l'activation de AR. Nous pourrions ainsi supposer que sa fraction cytosolique stabilise AR en absence de son ligand, facilite son transfert dans le noyau et que la fraction nucléaire favorise son repliement pour qu'il se lie à l'ADN. Pour répondre à ces différentes hypothèses, nous pourrions envisager des expériences de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) couplées à de la microscopie en temps réelle sur des cellules vivantes. Cette technique est basée sur l'émission d'un faisceau de fluorescence d'une longueur d'onde donnée lors du rapprochement de deux protéines couplées à deux fluorophores distincts. Ainsi, nous pourrions localiser non seulement l'espace, mais aussi dans le temps, l'interaction entre les deux partenaires. Cette



technique, certes un peu lourde, est néanmoins réalisable et décrite dans le travail de Chen et coll. (Chen et al., 2003).

Un moyen détourné pour mettre en évidence la nécessité de l'interaction AR-NPM au niveau nucléaire pour l'activité transcriptionnelle de AR serait de surexprimer dans des cellules LNCaP la forme mutante NPMc retrouvée très fréquemment associée aux pathologies de type AML (*acute myelogenous leukemia*) (Falini et al., 2005). La localisation de cette forme est cytoplasmique en raison d'une mutation qui affecte son domaine C-terminal responsable de la création d'un signal d'export nucléaire (Mariano et al., 2006). Il a été montré que la surexpression de la forme NPMc en cellules délocalise aussi la forme sauvage dans le cytoplasme (den Besten et al., 2005). La co-transfection d'un vecteur rapporteur nous renseignerait sur la capacité de AR à activer la transcription.

L'état de phosphorylation de la nucléophosmine pourrait être un élément critique sur ses différents niveaux de régulations du récepteur des androgènes. Nous avons fait l'hypothèse que NPM pourrait interagir préférentiellement avec AR dans des cellules en état de prolifération par rapport aux cellules différenciées en raison d'un niveau de phosphorylation différent. Il serait assez simple d'apporter quelques arguments à cette hypothèse en réalisant une immunoprécipitation de NPM dans chacun des états et en mesurant son niveau de phosphorylation général ou de résidus spécifiques à l'aide d'anticorps.

La protéine kinase CK2 pourrait aussi jouer un rôle fondamental sur l'interaction AR/NPM en raison de ses différents effets sur l'activité de NPM (transfert cytoplasme/noyau, affinité au substrat). Nous savons de plus que son activité et sa localisation sont régulées par les androgènes. L'utilisation d'un inhibiteur de la CK2 (apigénine), sur des cellules traitées avec de la DHT, suivie d'un fractionnement cellulaire et d'une détection AR en western-blot nous renseignerait sur l'éventuelle implication de NPM dans le transfert nucléaire de AR. Ces expériences seraient couplées à des immunoprécipitations de chromatine pour détecter le recrutement de AR sur les AREs du promoteur du gène *PSA*. Pour confirmer l'intervention de CK2 dans les différentes activités de AR, un mutant de NPM pour son site de phosphorylation par la CK2 (sérine 125) pourrait être utilisé en parallèle. Le remplacement de la protéine sauvage NPM pourrait se faire grâce à la spécificité des ARN interférents qui ciblent les ARN à une base près.

Afin de mieux comprendre les résultats obtenus en immunoprécipitation de chromatine, il serait intéressant de réaliser une cinétique de recrutement de AR et la nucléophosmine avec



des temps d'induction à la DHT plus rapprochés d'une part et plus longs dans le temps d'autre part (les expériences ont été réalisées jusque là pour un temps de 2 heures d'induction). Le recrutement de AR et de ses co-facteurs résulte en effet d'interactions dynamiques et cycliques. La vision figée des évènements chromatinien que l'on peut obtenir avec un seul temps ne représente certainement pas la complexité existante. Dans ces expériences, serait incluse l'immunoprécipitation de p300 pour appréhender son éventuelle implication dans l'activité histone chaperonne de NPM. De plus, des expériences similaires sur le promoteur d'un autre gène androgéno-régulé tel que cela a été réalisé pour NKX3-1 (*NK3 transcription factor locus 1*) ou B2M ( *$\beta$ -2-microglobuline*) dans les cellules LNCaP, permettraient de déterminer si les profils de recrutement de NPM et de AR sont spécifiques du promoteur du gène *PSA* ou bien généraux pour les promoteurs androgéno-régulés (Yoon and Wong, 2006).

#### B. La nucléophosmine et le cancer de la prostate.

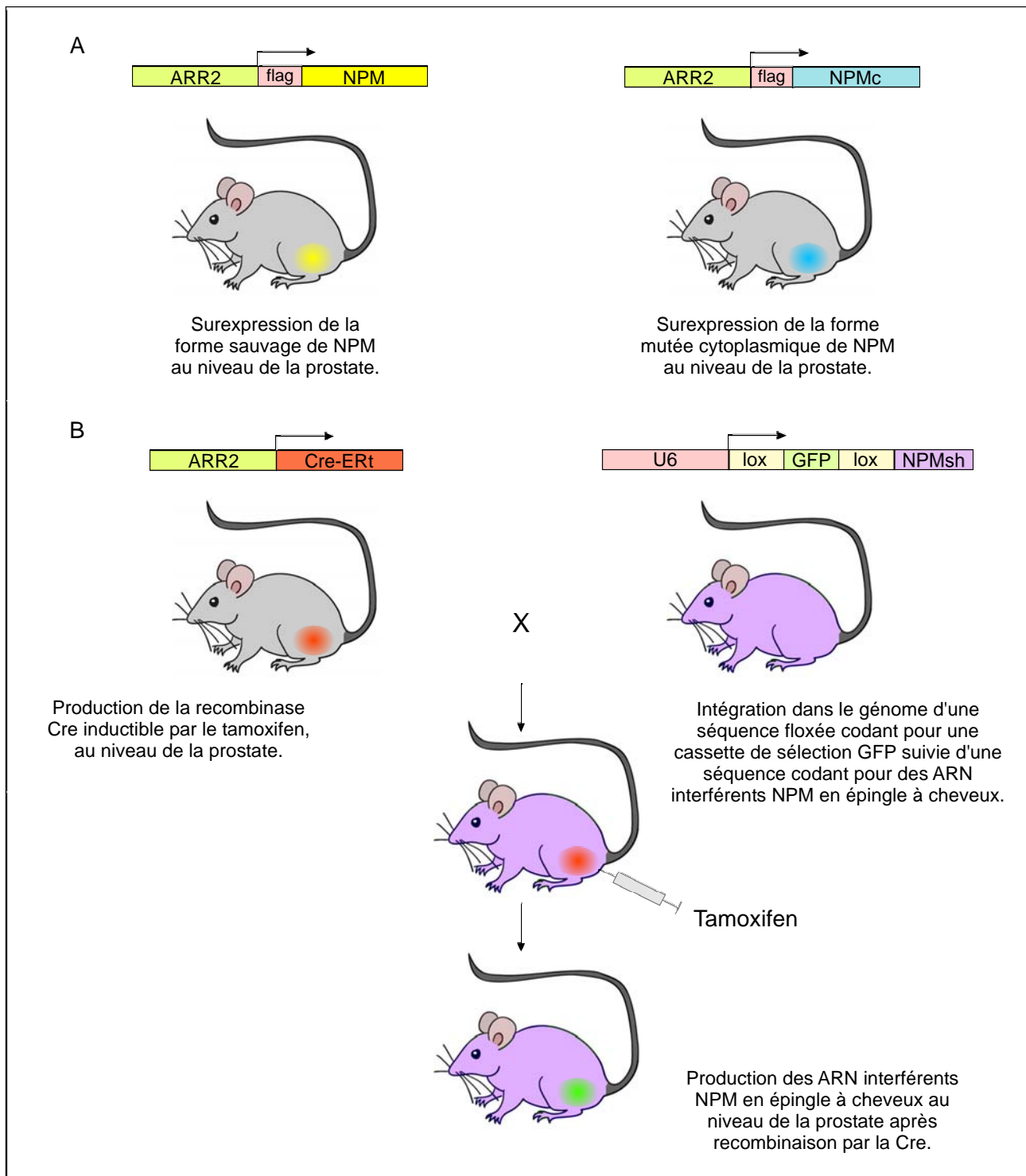
Nos résultats suggèrent que la nucléophosmine pourrait être impliquée dans le cancer de la prostate par une dérégulation de son niveau d'accumulation et par le contrôle de l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes. Les observations réalisées sur le contrôle de AR ont été réalisées dans un contexte de cellules tumorales de la prostate et celles sur l'expression de NPM sur des échantillons humains de cancers prostatiques. Il apparaît maintenant la nécessité d'étudier le rôle de NPM dans cette pathologie au niveau de modèles animaux pour confirmer nos résultats.

Trois types de modèles pourraient être réalisés :

1°- la création de souris surexprimant NPM au niveau de la prostate pour évaluer sa capacité à induire un développement tumoral.

2°- l'invalidation ciblée de la nucléophosmine au niveau de la prostate pour apprécier son rôle sur le contrôle de l'activité du récepteur des androgènes et la physiologie de l'organe.

3°- l'invalidation de la nucléophosmine dans un modèle de xénogreffe afin d'étudier son activité sur la progression tumorale et éventuellement sur l'acquisition d'une croissance androgéno-indépendante.



**Figure n°46: Modèles de souris transgéniques pour l'étude de l'implication de la nucléophosmine dans la carcinogenèse prostatique.**

**A.** Modèles de surexpression de la forme sauvage ou de la forme mutée cytoplasmique de la nucléophosmine au niveau de la prostate. L'utilisation du promoteur modifié ARR2 de la probasine permet un ciblage spécifique des transgènes au niveau des cellules épithéliales de la prostate au moment de la puberté des animaux, suite à la production d'androgènes.

**B.** Modèle de production d'ARN interférents contre la nucléophosmine de façon inducible et spécifique au niveau de la prostate. Le promoteur ARR2 permet l'expression ciblée de la recombinaise Cre non-fonctionnelle au niveau de la prostate. Ces souris transgéniques sont croisées avec une autre lignée de souris qui portent dans leur génome une séquence codant pour des ARN interférents en épingle à cheveux (NPMsh: short hairpin). Chez les descendants, l'injection de tamoxifen active la recombinaise Cre qui effectue la recombinaison entre les deux sites Lox et induit la production des ARN interférents spécifiquement au niveau de la prostate.



1°- Afin de surexprimer la nucléophosmine spécifiquement au niveau de la prostate, nous disposons au laboratoire d'un vecteur qui cible l'épithélium prostatique au moment de la puberté des animaux lorsque la fonction du récepteur des androgènes est activée (Don du professeur RJ Matusik, Nashville, Tennessee) (**figure n°46A**). Ce vecteur a été généré à partir du promoteur du gène de la *probasine*. La probasine est une protéine dont l'expression est spécifiquement régulée par les androgènes dans le noyau des cellules épithéliales de la prostate de rat et que l'on retrouve dans les sécrétions prostatiques. Sa séquence peptidique révèle une appartenance à la famille des lipocalines mais sa fonction est encore inconnue. Pour réaliser le promoteur modifié de la probasine, les séquences inhibitrices distales originelles ont été supprimées et la région proximale contenant deux ARE a été placée en tandem. On se retrouve ainsi avec un promoteur composite dénommé ARR2 de 462 bp contenant quatre AREs. Des tests d'activité indiquent que ce promoteur est fort, régulé par les androgènes et l'établissement de souris transgéniques ARR2-probasin-CAT révèle la spécificité de son activité dans les cellules épithéliales de la prostate au moment de la puberté des animaux (Zhang et al., 2000b). Ainsi, il ne resterait qu'à insérer dans le vecteur que nous possédons la séquence codant pour la nucléophosmine et à procéder à de la transgénèse additive. De plus, une séquence ajoutée en aval du promoteur et codant pour l'étiquette Flag permet de générer une protéine étiquetée afin de distinguer la protéine néo-synthétisée et la protéine endogène. Ce vecteur a d'ailleurs été utilisé par notre équipe pour générer des modèles animaux surexprimant un récepteur des androgènes sauvage ou muté dans la prostate. Les lignées fondatrices sont actuellement en cours d'obtention. L'analyse histologique des prostates surexprimant la nucléophosmine chez des animaux d'âge variables après la puberté nous permettrait de déterminer précisément sa possible implication dans la pathologie tumorale. De même, des cultures primaires de prostate seraient un outil intéressant pour étudier l'impact d'une surexpression de NPM sur la signalisation androgénique. Une même approche pourrait aussi être envisagée avec la surexpression de la forme mutée cytoplasmique de NPM qui est aussi largement impliquée dans la pathologie tumorale comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent.

2°- Les modèles animaux concernant l'invalidation de la nucléophosmine qui existent à ce jour correspondent à des systèmes non-inductibles (Grisendi et al., 2005) (Colombo et al., 2005). L'invalidation totale de NPM (NPM<sup>-/-</sup>) se traduit par une mort embryonnaire aux stades E11.5, E12.5. Si les animaux hétérozygotes (NPM<sup>-/+</sup>) sont viables, aucune information n'est donnée sur un phénotype qui pourrait nous renseigner sur l'activité du récepteur des androgènes ou d'autres récepteurs nucléaires. Nous pourrions donc envisager une diminution



du niveau d'accumulation de la nucléophosmine ciblée au niveau de la prostate et de façon inductible après son développement et sa mise en place fonctionnelle (*figure n°46B*). Il semble important de ne pas complètement invalider NPM au vu de son rôle critique sur la physiologie cellulaire. Un système très ingénieux a été développé afin de créer des animaux transgéniques qui puissent produire des ARN interférents en épingle à cheveux, et ce de façon inductible par la recombinaise Cre (*cellular recombinaise*) (Ventura et al., 2004). Le vecteur dénommé pSico permet de créer des animaux transgéniques par infection de cellules ES à l'aide de lentivirus. Il porte une cassette GFP qui permet de facilement vérifier sa transmission à la descendance des souris obtenues à partir des cellules ES infectées. Cette cassette est encadrée entre deux sites Lox et sépare le promoteur et la séquence codant pour les ARNi ; en absence de recombinaise Cre, les ARNi ne sont pas produits. Le vecteur pSico-NPM existe déjà et fonctionne parfaitement en contexte cellulaire. Des animaux transgéniques témoignant de l'efficacité du système ont été créés pour le marqueur de surface CD8 des lymphocytes T. Afin de diriger la production des ARNi au niveau de la prostate et surtout de manière contrôlée après son développement, nous utiliserions un système inductible Cre-ERT (*cellular recombinaise fused to mutated estrogen receptor LBD*) sous le contrôle d'un promoteur ARR2 (Weber et al., 2001). Le croisement des deux lignées murines transgéniques (pSico-NPM et ARR2-CRE-ERT) permettrait d'obtenir des animaux dont la Cre serait produite spécifiquement au niveau de l'épithélium de la prostate. Son activation se ferait par un traitement court des souris avec du tamoxifène et conduirait à la production locale d'ARN interférents dirigés contre NPM. Les études phénotypiques nous renseigneraient alors sur le rôle de NPM dans la physiologie prostatique.

3°- Il serait également intéressant d'analyser l'effet d'une invalidation de NPM sur une tumeur déjà établie. Pour se rapprocher le plus possible d'un modèle pathologique *in-vivo*, nous pourrions utiliser le modèle de xénogreffe CWR22 (Wainstein et al., 1994). La qualité de ce modèle réside dans sa capacité à reproduire le développement et l'évolution de la tumeur prostatique humaine. En effet, la croissance de la xénogreffe CWR22 en souris nude est stimulée par les androgènes tout comme l'expression du marqueur PSA que l'on retrouve à un taux très élevé au niveau sérique. En revanche, la privation androgénique résulte en un arrêt momentané de prolifération des cellules de la xénogreffe et un retour à la normale du niveau de PSA. Certains animaux développent ensuite des tumeurs à croissance androgéno-indépendante CWR22R qui s'accompagnent d'un retour élevé du taux sérique de PSA. La castration des souris portant une xénogreffe CWR22 permet d'augmenter leur durée de vie de 3 à 4 fois



(Nagabhushan et al., 1996). Ainsi, il serait possible d'envisager la création d'une lignée stablement transfectée CWR22 avec un vecteur de type pSUPER-NPM (Brummelkamp et al., 2002b). Ce dernier induit la formation d'ARN interférents en épingle à cheveux sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase III et qui se transmet au cours des divisions cellulaires au moins jusqu'à deux mois après transfection. Une autre alternative pour éviter la sélection clonale serait l'utilisation du système pRETRO-SUPER qui autorise l'infection rétrovirale (Brummelkamp et al., 2002a). Ainsi, on pourrait induire la formation d'ARN interférents en infectant une population entière de cellules CWR22 qui serait ensuite greffée aux souris. Ce système est fonctionnel puisqu'il a été testé et validé pour la réduction de tumeurs en xénogreffes induites par le proto-oncogène RAS cinq semaines après leur implantation. Ce délai semble être suffisant sachant que les souris portant une xénogreffe CWR22 meurent entre 6 et 12 semaines après la greffe si elles ne sont pas castrées. La formation de xénogreffes avec d'une part des cellules CWR22 non-transformées et d'autre part des cellules n'exprimant que des niveaux très faibles de NPM serait suivie de tests de prolifération, d'invasivité, et de mesure d'activité du récepteur des androgènes. Les études après échappement des tumeurs à la privation androgénique, qui nécessitent un délai plus long de l'ordre de 3 à 10 mois après castration, seraient conduites en injectant directement aux souris des ARN interférents. Plusieurs rapports démontrent l'efficacité de l'injection intra-veineuse ou directement intra-tumorale d'ARN duplex sur l'inhibition de la croissance tumorale (Fujii et al., 2006; Yano et al., 2004). Cette technique mise au point depuis quelques années seulement (Sorensen et al., 2003) ne cesse de se développer avec notamment l'utilisation de particules liposomales qui améliorent la distribution des ARN interférents aux cellules (Sioud, 2005). Ces expériences sur des tumeurs résistantes CWR22R nous renseigneraient sur la participation de la nucléophosmine dans la prolifération cellulaire indépendante des androgènes.

Les programmes de transgénèse sont évidemment très lourds à mettre en œuvre. La création et l'exploitation des modèles animaux nécessitent effectivement des investissements financiers conséquents, une logistique adaptée pour la réalisation de la transgénèse elle-même et le suivi des animaux, mais aussi une mobilisation de personnel pour l'étude des phénotypes. Cependant, à ce jour, ils représentent les meilleurs modèles pour l'étude de nombreuses pathologies humaines. Dans notre problématique, la transgénèse sera un moyen incontournable pour déterminer le rôle de la nucléophosmine dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate.



\*\*\*\*\*

## *Annexes*

\*\*\*\*\*





# Cross-talk between androgen receptor and EGF receptor signaling pathways: A molecular switch for epithelial cell differentiation

Laurent Léotoing\*, Michèle Manin\*, Didier Monté†, Silvere Baron\*, Yves Communal‡, Georges Veyssière\*, Laurent Morel\* and Claude Beaudoin\*.

\*Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, UMR 6547 CNRS-Université Blaise Pascal, Campus Universitaire des Cézeaux, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.

†UMR 8161 Institut de Biologie de Lille/CNRS/Université de Lille 1/Université Lille2/ Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France.

‡Laboratoire d'Immunologie, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France.

**Short title : AR and EGFR interactions during epithelial cell differentiation**

**Keywords :** androgens; cell proliferation and differentiation; EGFR signaling

**Corresponding Author :** Laurent Morel, Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, UMR 6547 CNRS, Equipe Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France, Tel. +33 473407756; Fax. +33 473407042; E-Mail: [Laurent.MOREL@univ-bpclermont.fr](mailto:Laurent.MOREL@univ-bpclermont.fr)

## ABSTRACT

In the male, androgens promote growth and differentiation of sex reproductive organs through ligand activation of the androgen receptor (AR). Here, we show that androgens are not major actors of the cell cycle arrest associated to the differentiation process, and that the EGF-mediated signaling interferes with AR activities to regulate androgen response when epithelial cells are differentiated. High AR expression correlates with enhanced androgen responsiveness and reduction of phosphorylated ERK1/2 over differentiation. These modifications are associated with recruitment of cells in phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, up-regulation of p27<sup>kip1</sup>, down-regulation of p21<sup>Cip1</sup> and p53 proteins, and accumulation of hypo-phosphorylated Rb. Exposure to EGF reduces AR expression levels and blocks androgen-dependent transcription in differentiated cells. It also restores p53 and p21<sup>Cip1</sup> levels, Rb hyper-phosphorylation, ERK1/2 activation and promotes cell cycle re-entry as p27<sup>kip1</sup> protein levels are decreased. Treatment with a MEK inhibitor reverses the EGF-mediated AR down-regulation in differentiated cells, thus suggesting the existence of an inverse correlation between EGF and androgen signaling in non tumoral epithelia. Interestingly, when androgens signaling is settled in differentiated cells, DHT favours the phosphorylation of EGFR while it exerts a paradoxical inhibitory effect on ERK activity, indicating that androgens are able to disrupt the EGFR-ERK cascade. Overall, our data demonstrate the existence of a balance between AR and MAPK activities that either favours the maintenance of differentiated conditions, or the enhancement of cell proliferation capacities.

## INTRODUCTION

Androgens mediate a wide range of physiological responses in the male reproductive system. They also play a critical role in the development and differentiation of the urogenital tract and especially in the functional maturation of accessory sex organs from early foetal life throughout adulthood (reviewed in (Hughes-Fulford *et al.*, 2001)). These effects of androgens are temporally coordinated by ligand activation of the androgen receptor (AR)<sup>1</sup>. AR is a nuclear transcription factor which binds to androgen-responsive elements along with co-activators and general transcription factors, to control transcription of androgen-regulated genes (reviewed in (Heinlein & Chang, 2002)).

During early foetal life, AR is present only in mesenchymal cells of the urogenital tract suggesting that androgens may regulate epithelial morphogenesis

and growth via mesenchymal paracrine-acting factors (Cunha *et al.*, 1992). This idea is strengthened by ontogenic studies, which have demonstrated that androgen-responsive mesenchyme in the prostate can elicit a tissue-specific morphologic development of the epithelium, assessed to be negative for AR expression (Cunha, 1996). Altogether, these findings suggest that androgen-induced epithelial cell proliferation in male reproductive tract could be regulated at least by an indirect pathway involving paracrine mediators produced by stromal cells, such as insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF) and epidermal growth factor (EGF) (Byrne *et al.*, 1996, Cunha & Donjacour, 1989).

Nevertheless, in the developing prostate as well as in the Wolffian-derived sex accessory organs (*vas deferens*, epididymis and seminal vesicles), epithelium growth and terminal differentiation give rise to a mature non-dividing cell population that



expresses AR. These epithelial cells are highly dependent on androgenic content for the maintenance of their differentiated functions and their survival. Several studies have contributed to elucidate the mechanisms of AR actions in these different processes amongst which the existence of a crosstalk between the AR signaling pathway and growth factor receptor pathways : EGF activation of the AR promoter (Culig *et al.*, 1994), androgen-mediated EGFR up-regulation (Myers *et al.*, 1999, Topping *et al.*, 2003), activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by androgen-activated AR (Peterziel *et al.*, 1999), enhancement of AR transcriptional activity by peptide growth factors (Bok & Small, 2002), and AR interactions with the mitogen-activated protein kinase/extracellular signaling-regulated kinase kinase-1 (MEKK1) and the EGFR (Abreu-Martin *et al.*, 1999, Bonaccorsi *et al.*, 2004). These findings suggest that the interaction between these two pathways may be crucial too for the acquisition and the maintenance of androgen sensitivity.

However, most of these studies were conducted in prostate tumour cells, so that both the AR contribution to a normal differentiation process and the cross-talk between androgens and EGF signaling pathways in differentiated cells still remain unclear.

In previous studies, we showed in non-transformed *vas deferens* epithelial cells that endogenous AR expression as well as AR transcriptional activity were regulated by insulin and EGF, through an activation of the PI3K transduction pathway (Manin *et al.*, 2000, Manin *et al.*, 1992, Manin *et al.*, 2002). We now report that androgens do not play a major role in the cell cycle arrest associated with cell differentiation, but that the acquisition of androgen-dependent activities is a consequence of this process. In these conditions, EGF-activated MAPK signaling cascade interferes with AR functions to down-regulate androgen responsiveness. Up-regulation of AR following the onset of differentiation correlates with inhibition of ERK1/2 activity and exposure to EGF quickly restores pERK1/2 levels while AR is partially lost. Moreover, the blockade of ERK restores AR functions in these cells and abolishes EGF-mediated inhibition of AR-dependent activities. Lastly, our data show that, when active in differentiated cells, androgens signaling is able to reduce phospho-ERK1/2 but to enhance EGFR phosphorylation, thus pointing a disconnection between the EGFR and the MAPK cascade in response to androgens.

## RESULTS

### ***Epithelial Cells Differentiation is Characterized by a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Cell Cycle Arrest, a Marked Decrease in the MAPK Pathway Activity and an Increase in AR Accumulation.***

Androgen-sensitive mouse *vas deferens* epithelial cells (VDEC) are able to grow, to polarise and then to express specific marker of differentiation

(AKR1B7/MVDP) when seeded at confluency onto matrigel-coated microporous membrane (Manin *et al.*, 2000). Morphological changes associated to cell polarisation are observable under inverse microscope. In the present study we analysed changes in the cell cycle status during this differentiation process. As shown in fig.1a cell differentiation was associated with an increasing number of cells blocked in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase as assessed by flow cytometric analysis. Differentiated cells were also characterized by a marked decrease in hyper-phosphorylated *retinoblastoma* (ppRb), p21<sup>Cip1</sup> and p53 proteins (10, 30 and 40 % of the control values respectively). This decrease was associated with a parallel increase in the accumulation of the p27<sup>Kip1</sup> protein (Fig. 1b), thus assessing cell cycle arrest at the molecular level. Interestingly, the presence of DHT in the culture medium did not change significantly the expression levels nor the phosphorylation status of the cell cycle regulators. This was also true during the time course of differentiation (not shown), suggesting that androgens do not play an important role in growth arrest associated with this process. On the contrary, several reports have connected the MAPK pathway with normal cell cycle progression (reviewed in (Roovers & Assoian, 2000)). As shown in fig 1c, a marked decrease leading to a complete inhibition of ERK1/2 basal phosphorylation was observed when VDEC are differentiated in a basal medium (lanes 1 & 3). Eventhough basal level of phospho-ERK1/2 are decreased following differentiation, VDEC still remained responsive to mitogenic factors as a 5 min exposure to EGF led to the phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 1c; lanes 2 & 4) even if lowered compared to proliferating cells. Interestingly, this was correlated to a strong augmentation in androgen receptor expression that mainly resulted from an increase in AR mRNA levels (fig 1d). All these data suggest that the down-regulation of the MAPK pathway, could directly or indirectly lead to the androgen receptor expression. Furthermore, this result clearly shows that androgens are dispensable for promoting either cell proliferation or cell differentiation processes, but that a differentiated cell status is required for activating the androgen receptor expression.

### ***Decrease in MAPK Activity during Epithelial Cell Differentiation is Intrinsic to the Differentiation Program***

Proliferation of non-transformed cells is regulated by cell-cell contacts, which are referred to as contact-inhibition. Thus, in addition to the availability of mitogenic factors, cell density may be considered as a key regulator of the MAPK pathway and of the subsequent androgen receptor expression. Cell density determines the establishment of tight junctions between adjacent polarised cells (Day *et al.*, 1999, Takahashi & Suzuki, 1996) and can be associated to the re-localization of the cytoplasmic  $\beta$ -



catenin to the plasma membrane. To test the influence of cell density on the status of the MAPK pathway, VDEC were conducted to form both low and high density polarised monolayers. To do so, cells were allowed to polarise and differentiate in the absence or in the presence of EGF (10 ng/ml). Interestingly, EGF acts as an enhancer of cell cycle progression and favours cell proliferation, but it is unable to interrupt a differentiation program and only delays the full differentiation of the monolayer (not shown). In the presence of EGF, cells were of small size diameter and highly compacted. They presented  $\beta$ -catenin localized at the plasma membrane, supporting a full sequestration of this protein to the E-cadherin, whereas growth-factor free cultures were of low density with large cells characterized by cytoplasmic  $\beta$ -catenin dots, suggesting that the endogenous  $\beta$ -catenin signaling pathway was not fully inactivated. (Fig. 2a).

The capacity of the MAPK pathway to be activated in response to EGF was evaluated by measuring the ERK phosphorylation status at different stages of the differentiation process (16, 48, 72 and 96h) in both low and high density cultures. Following a 3h incubation in minimum medium, cells were stimulated for 5 min with EGF 10 ng/ml. Phospho-ERK1/2 accumulation was diminished by 40% in low density monolayers while it was dramatically decreased (80%) in the high density cell populations (fig 2b). This was associated with the reduction of the cytoplasmic pool of  $\beta$ -catenin (fig 2a) suggesting that the progressive inactivation of MAPK during epithelial cell differentiation is not directly dependent on mitogenic factors but rather results from the establishment of cell-cell tight junctions involving E-cadherin signaling. That could lead to the loss of sensitivity to EGF as it was already shown in high density breast epithelial cells cultures where it prevents EGFR activation (Takahashi & Suzuki, 1996).

#### ***EGF-Activated Signaling Pathway Promotes Cell Cycle Re-entry of Differentiated Cells and Interferes with AR Functions***

As androgen receptor expression is correlated to a decrease in the MAPK activity, we then tested the ability of EGF to reverse AR signaling and cell cycle status in differentiated cells cultured at low density. A 24h stimulation with EGF induces the whole differentiated monolayer to proliferate again as attested by their morphological features observable under inverse microscope (fig. 3a). Re-entry into the cell cycle was evaluated by FACS analysis of the cell population. Their proportion in S phase rose significantly from 12% to 23% ( $p < 0.01$ ) while it decreased from 70% to 55% in the G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase (fig 3b). Consistent with these observations, EGF treatment totally restored ppRb expression, increased both p21<sup>Cip1</sup> and p53 protein levels and decreased p27<sup>Kip1</sup> (Fig. 3c).

Cell differentiation is marked by the up-regulation of AR expression in response to DHT. However, incubation of cells with increasing concentrations of

EGF induced a dose-dependent decrease in AR expression parallel to an increased phosphorylation level of ERK1/2 (fig. 4a). This result was strengthened by the loss of AR target gene expression, such as AKR1B7, in the same conditions (fig 4b).

Since ERK1/2 activation is regulated by the upstream kinase MEK, we next examined the effect of PD098059, a pharmacological inhibitor of MEK, on AR accumulation. Blockade of MAPK activity with 20  $\mu$ M PD098059 both decreased the phosphorylation levels of both ERK1/2 proteins and enhanced basal and DHT-induced AR expression (fig. 4c).

These data clearly indicate that AR expression is negatively correlated to EGF-induced stimulation of the MAPK pathway and to cell cycle activation. They also suggest that the EGF-mediated signaling pathway interferes with yet undefined events triggering AR accumulation as well as androgen-dependent transcriptional activity in differentiated cells.

#### ***Androgens Down-Regulate Basal ERK Activity reduce EGF-Induced MAPK Activation and Modulate EGFR Phosphorylation in Differentiated Cells***

Cells present a full active androgen signaling capacity when they have completed their differentiation process, as attested by the high androgen receptor expression. Interestingly, pERK1/2 was reproducibly lowered in cells differentiated in presence of DHT (fig 5, lanes 3 & 4), whereas no significant effect of androgens could be observed on ERK phosphorylation status following a 5 min EGF stimulation in proliferative cells (fig 5, lanes 1 & 2). It is likely that androgens could act as a supplemental down-regulator of the EGF signaling pathway in differentiated cells to that dependent of the differentiation process itself. To test this hypothesis, we next determined the EGF receptor phosphorylation status on tyrosine residues 1068 (not shown) and 1173 (fig. 6) using low density cells grown to differentiation in presence of androgens. As expected, there were low levels of ERK phosphorylation but surprisingly phospho-EGFR levels (both Tyr1068 and Tyr1173) were greatly increased compared to untreated cells (fig. 6a, lanes 1 & 2). Cells differentiated in the absence of DHT and further stimulated for 5 min with 10 ng/ml EGF, exhibited increased EGFR phosphorylation and high ERK1/2 phosphorylation. However, a same short EGF treatment of cells differentiated in the presence of DHT also led to a high phosphorylation level of EGF receptor but to a reduced phosphorylation level of ERK (fig. 6a, lanes 3 & 4). It is likely that EGFR phosphorylation and pERK1/2 down-regulation in response to DHT are two independent events suggesting that EGFR and ERK pathway might be



disconnected depending on the hormone or the growth factor used as stimulator.

To further evaluate this androgen effect, we analysed the changes in EGFR phosphorylation status and MAPK activity in cells cultured in medium containing EGF (high density cells) in the presence of increasing concentrations of DHT. As shown in fig. 6b, AR expression and AKR1B7 accumulation, a target gene of androgens action, augmented in a dose-dependent manner. Conversely, phosphorylation levels of ERK1/2 decreased dramatically in response to DHT from 10 nM concentration. As already observed in low density cells, phosphorylation of EGFR was stimulated in a dose-dependent manner by DHT and was not correlated to ERK phosphorylation (Fig. 6b).

We next determined whether the androgen receptor was involved in the interaction between androgens and EGF signaling. VDEC cells were treated with the anti-androgen bicalutamide, a specific antagonist of the androgen receptor, whose efficacy was assessed by the inhibition of AR up-regulated levels in response to androgens (fig. 6c). Bicalutamide decreased EGFR phosphorylation by almost 50% indicating that this effect is dependent on the presence of AR (fig. 6c). To assess this result, AR expression was knocked-down using specific siRNA. As shown in fig. 6d siRNA-dependent decrease in AR expression was associated to a parallel decrease in EGFR phosphorylation that confirms that AR is involved in androgen-dependent phosphorylation of EGFR. To test whether or not the two proteins could physically interact as proposed by Bonaccorsi *et al.* (Bonaccorsi *et al.*, 2004), we performed co-immunoprecipitation experiments but did not detect the partner protein using either AR antibody or EGFR antibody (not shown).

## DISCUSSION

The results described herein demonstrate that an increase in androgen sensitivity is acquired during epithelial cell differentiation, but that androgens do not play a significant role in the growth arrest during the differentiation process. On the contrary, androgens action, which seems to be essential for the maintenance of differentiated functions, requires cell cycle exit for dosage-dependent or efficient AR signaling.

Expression and transcriptional activity of endogenous AR are augmented during epithelial cell differentiation. This is reflected by an androgen-independent increase in AR steady-state mRNA level, suggesting that transcriptional activation of the AR gene or yet unclear mRNA stabilisation mechanisms might be activated during the differentiation program. Furthermore, once cells are differentiated, the clear accumulation of the AR protein in response to androgens is likely to be exerted at the post-transcriptional level since no such change was observed in AR mRNA (Manin *et al.*, 2002). This could result from a greater mobilisation of AR mRNA at the

polyribosomes, enhanced translation efficiency but also from post-translational modifications increasing stability of AR as already described (Burnstein *et al.*, 1995, Mizokami *et al.*, 1992, Wolf *et al.*, 1993). This up-regulation of AR activity parallels with a change in the level of key cell cycle regulatory proteins and with a decrease in the active pERK1/2. This is consistent with the recent finding that in G<sub>0</sub>, AR enhances transcription of steroid-responsive mouse mammary tumour virus promoter and from an integrated androgen-specific probasin promoter (Martinez & Danielsen, 2002). This is also in accordance with immunocytochemical detection of AR in the prostate, showing high AR expression as well as AR phosphorylation at the Ser213 (Taneja *et al.*, 2005) in differentiated luminal cells but not in basal proliferating cells (El-Alfy *et al.*, 1999, Prins *et al.*, 1991).

Entrance into G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase is indicated not only by the rapid reduction of Rb protein itself but also by the change in the Rb phosphorylation pattern, inhibition of the p53/p21<sup>Cip1</sup> pathway and increase p27<sup>Kip1</sup> protein level. Amount of the p21<sup>Cip1</sup> and p53 proteins were decreased when epithelial cells were induced to differentiate and treatment with the proteasome inhibitor MG-132 restored both protein levels (not shown). Thus, p21<sup>Cip1</sup> expression in differentiated cells is down-regulated by a specific proteasome-mediated pathway as documented in a number of cell lineages (Cayrol & Ducommun, 1998, Fukuchi *et al.*, 2002, Maki & Howley, 1997, Maki *et al.*, 1996, Rousseau *et al.*, 1999, Sheaff *et al.*, 2000). Maintenance of low levels of p21<sup>Cip1</sup> suggests that this cdk inhibitor could play a suppressing rather than a favouring function in the induction of differentiation, and such an inhibitory function of p21<sup>Cip1</sup> in the differentiation of primary mouse keratinocytes was previously reported (Di Cunto *et al.*, 1998, Dotto, 2000). We also found lower p53 protein levels in differentiated cells than in proliferating cells, as reported in recent studies revealing that the tumour suppressor protein p53 may drive to cell differentiation (Crochemore *et al.*, 2002, Saifudeen *et al.*, 2002). The strong  $\beta$ -catenin expression associated with cell-cell junctions we observed in differentiated cells on-going conformational changes (this study and (Manin *et al.*, 2000)) may explain the reduction of functionally competent p53 through an ubiquitin-mediated proteolysis since  $\beta$ -catenin can no longer interact with p53 and interfere with the normal proteasomal degradation (Damalas *et al.*, 1999). p53 was also demonstrated to play a role in sensing abnormal structuration of *zonula adherens* and consequently induces apoptosis to remove abnormal cells from tissue (Yamaguchi *et al.*, 2004), thus it appears reasonable that p53 should not be expressed in newly formed differentiated intact monolayer. Nevertheless, the rapid p53 down-regulation measured over the differentiation process cannot account for the





increased accumulation of AR protein (Shenk *et al.*, 2001) nor for the downstream activation of AR-regulated genes, since adenoviral-mediated p53 overexpression did not elicit any change in AR expression level (our unpublished results). In most cell types, p27<sup>Kip1</sup> arrests cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> through interaction with cyclin-CDK complexes (Polyak *et al.*, 1994, Toyoshima & Hunter, 1994). This could relieve AR from its known repression by cyclin D1 (Petre-Draviam *et al.*, 2005). This accumulation of p27<sup>Kip1</sup> may occur in part through the transcriptional activation of the p27<sup>Kip1</sup> gene; however, it could also result from a decreased proteasomal degradation by the skp2-containing Skp-Cullin-F-box (SCF<sup>skp2</sup>) complex (Carrano *et al.*, 1999, Pagano *et al.*, 1995, Sutterluty *et al.*, 1999, Tsvetkov *et al.*, 1999). Our study shows that, p27<sup>Kip1</sup> protein expression is not regulated by androgens in normal cells contrary to what was demonstrated in prostate adenocarcinoma models (Kokontis *et al.*, 1998). In VDEC, the E-cadherin/beta-catenin/p27(Kip1) axis is probably the major regulatory mechanism involved in the contact-inhibition of cell proliferation as demonstrated for thyroid cells by Motti *et al.* (Motti *et al.*, 2005).

Although the up-regulation of AR activity coincides with a change in the level of key cell cycle regulatory proteins, it is associated to a decrease in the abundance of active pERK1/2. Cell differentiation is also associated to a same decrease in pERK1/2 in response to EGF stimulation, similar to what was observed in various cell types such as vascular endothelial cells (Vinals & Pouyssegur, 1999). The EGF-receptor (EGFR), which mediates EGF effects, is postulated to play an important role in regulating growth and differentiation. Thus, interruption of EGFR kinase function was shown to block proliferation of A431 cells and to reversibly arrest their cell cycle in the G<sub>1</sub> phase (Busse *et al.*, 2000). Inactivation of the EGFR kinase function through the cellular differentiation process may account for growth arrest and alteration of cell cycle regulatory protein levels as already proposed by Busse *et al.* (Busse *et al.*, 2000). In contrast, MAPK activation was found constitutive in proliferating cells such as prostate epithelial cancer cells (Oka *et al.*, 2005). Down-regulation of the binding capacities of several growth factors (EGF, PDGF, FGF) and of their intracellular effects were described as a function of cell density associated with cell junction formation (Rizzino *et al.*, 1988, Takahashi & Suzuki, 1996) and with the activation of protein tyrosine phosphatases (Mansbridge *et al.*, 1992, Sorby & Ostman, 1996). Our data could be explained in part by an intercellular junction-mediated clustering of tyrosine kinase receptor (Takahashi & Suzuki, 1996). Such a mechanism could prevent EGFR activation when VDEC cells are seeded at confluency and allowed to differentiate. Moreover, the fact that E-cadherin-dependent growth arrest resulted in dephosphorylation of the Rb protein and in an increase of p27<sup>Kip1</sup> level (Day *et al.*, 1999, St Croix *et al.*, 1998)

raised the question whether E-cadherin is associated with the regulatory aspects we found following epithelial cell differentiation. Confirmation of these assumptions will require both the assessment of the EGFR-binding capacities and tyrosine kinase activities, and the characterization of E-cadherin functions in the adhesion-dependent epithelial cell differentiation and in the acquisition of androgen responsiveness.

The data obtained with EGF support a causal association between the induced changes in the cell cycle regulatory proteins and the androgen responsiveness that follows G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest and epithelial cell differentiation. The EGF-mediated AR down-regulation is consistent with the previous report by Mizokami *et al.* (Mizokami *et al.*, 1992) where AR protein half-life was found shortened and AR mRNA down-regulated in LNCaP cells exposed to EGF for 24 hours (Mizokami *et al.*, 1992).

Interestingly, our results also demonstrate that exposure to DHT was able to down regulate ERK activity in androgen-responsive differentiated cells similarly to the inhibitory effects of androgens on MAPK activities previously described in rat granulosa cells (Kayampilly & Menon, 2004) and in osteoblasts (Wiren *et al.*, 2004). All these data suggest that androgens may suppress the EGFR signaling pathway as recently proposed (Gravina *et al.*, 2004). However, in differentiated VDEC androgen-dependent decrease in ERK phosphorylation levels is associated with a parallel increase in EGFR phosphorylation suggesting that DHT might dissociate the EGFR from its downstream MAPK pathway to connect another yet unidentified one.

There are evidences indicating that deregulation of the EGFR pathway plays a critical role in prostate cancer progression from an androgen-dependent to an androgen-independent state in patients who undergo hormonal therapy (Bonaccorsi *et al.*, 2004). In a recent clinical study, the MAPK activity detected in non-neoplastic prostate tissue raised significantly in prostate tumours with increasing Gleason score (Gioeli *et al.*, 1999). Of importance, levels of activated MAPK were further increased after androgen ablation treatment in tumour samples obtained from the same patients with recurrent prostate cancer (PCa) (Gioeli *et al.*, 1999). In our study ERK1/2 activation was lowered in differentiated cells treated with DHT. Because DHT down-regulates EGFR-mediated signaling in terminally differentiated VDEC cells, it might be hypothesized that androgens maintain low levels of EGF dependent activities in wild-type AR-expressing PCa cells and limit growth stimulation by EGF. In this sense, the presence of a functional AR in prostate cancer cells that down-regulate EGFR function (Gravina *et al.*, 2004), reduces malignant and invasion potential (Bonaccorsi *et al.*, 2000), and confer sensitization to anticancer therapy (Davis *et*



*al.*, 2003). The above-mentioned data support the idea that abrogation of androgen action by anti-androgen therapy may contribute to the conversion of androgen-sensitive tumours to a hormone refractory state and increased proliferation by growth factors. Our data suggest that androgens do not play a significant role in the growth arrest associated to the differentiation process in epithelial cells but rather act as essential supports in maintaining differentiated functions and, as recently proposed by Algarte-Genin *et al.* (Algarte-Genin *et al.*, 2004), a restored androgenic status might prevent the initiation of PCa in elderly men. Collectively, the results provided herein must be considered as a first step towards how and when androgen responsiveness phenotype is acquired over epithelial cell differentiation. However, much more efforts should be devoted for uncovering the relationship between EGFR signaling and cell cycle dependent acquisition of androgen responsiveness in order to better understand AR functions in normal epithelial cell differentiation and to further explore how dysregulation may contribute to the cancer growth of androgen-dependent organs such as the prostate.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals, Reagents and Antibodies**— Life Technologies (Cergy Pontoise, France) supplied the Dulbecco's modified Eagle (DMEM)/Ham's F12 medium, glutamine, Hepes, transferrin, phosphate buffered saline (PBS), and gentamycin. Bovine insulin, EGF, cholera toxin, dibutyryl cAMP, selenium, hydrocortisone, dihydrotestosterone (DHT) and matrigel were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Microporous PET membranes were from Becton Dickinson Labware (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). Rabbit polyclonal anti-AR (PG-21) antibody and mouse monoclonal anti-phospho-MAP kinase (12D4) and anti-phospho-EGFR (9H2) antibodies were purchased from Upstate Biotechnology (Euromedex, Mundolsheim, France), rabbit polyclonal anti-EGFR (Ab-17) antibody from Lab Vision Corporation (Interchim, Montluçon, France), mouse monoclonal anti-Rb antibody (G3-245) from PharMingen (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France), sheep polyclonal anti-p53 antibody (Ab-7) from Oncogene Research (Merck eurolab, Fontenay-sous-bois, France), rabbit polyclonal anti-p27<sup>Kip1</sup> (C-19) and anti-p21<sup>Cip1</sup> (C-19) antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France), and rabbit polyclonal anti-MAP kinase (M5670) and anti- $\beta$ -actin (C-11) antibodies were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Rabbit polyclonal anti-AKR1B7 (IL-3) antibody have been described elsewhere (Lefrançois-Martinez *et al.*, 2004).

**Cell Culture Conditions**— Mouse *vas deferens* epithelial cells (VDEC) were grown as previously

described (Baron *et al.*, 2004). Briefly, cells maintained in proliferation were seeded on serum fibronectin-coated plastic in medium supplemented with 10 ng/ml EGF. Differentiation of VDEC was allowed for 3 days after seeding onto matrigel-coated microporous membranes in 6-well plates at confluent density ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) in basal medium supplemented or not with EGF and/or DHT. The medium was changed every two days and experiments were repeated three times.

**Western Blot Analysis**— Cells were harvested, washed in cold ice PBS buffer, lysed in NaCl buffer (0.42 M NaCl, 20 mM Hepes, 1.5 M MgCl<sub>2</sub>, 0.2 M EDTA, 25 % glycerol, 0.1 % NP-40, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin), sonicated and centrifuged at 15,000 X g for 30 min at 4°C. Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Forty  $\mu$ g of total proteins were resolved through SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham Biosciences). Membranes were probed with antibodies specific for the indicated proteins and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit (P.A.R.I.S Biotech, Compiègne, France), sheep anti-mouse (Amersham Biosciences) or rabbit anti-sheep (Upstate Biotechnology) immunoglobulin G secondary antibodies, followed by enhanced chemiluminescence according to manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology).

**Northern blot Analyses**— Total RNA was isolated from VDEC cells using the Trizol method according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, France). Total cellular RNA (30 $\mu$ g) was electrophoresed on 1% denaturing formaldehyde-agarose gels and transferred onto positively charged nylon membranes. Filters were hybridized with [<sup>32</sup>P]dCTP-labelled probes (*akr1b7*, *AR*, *gapdh* and *18S*).

**SiRNA transfections**— Cells were seeded onto microporous membrane to engage a differentiation process, then transfected 2h later with 20 nM anti-AR siRNA duplexes (5'-GACTCAGCTGCCCCATC CA-3') using Metafectene (Biontex). As a control, we used a duplex of 19nt and two-dT overhang against the Green Fluorescent Protein at 20 nM (5'-ACTACCAGCAGAACACCCCTT-3'). Cells were grown to a differentiated state for 70h then treated or not with DHT 100 nM, and collected for western-blot analysis.

**Cell Cycle Arrests and Fluorescence-activated Cell Sorting Analysis**— VDEC were seeded in 6-well plates under conditions allowing cells to proliferate or to differentiate and cell cycle progression was measured in the presence or the absence of DHT. At



the desired time points, cells were trypsinized for 10 min, washed with PBS and cell samples ( $10^7$  cells/ml) were suspended in 50 µg/ml of propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) and 500 µg/ml of ribonuclease A (Sigma-Aldrich). The cells were stained for 30 min at 4 °C in the dark, then filtered through a 40-µm nylon mesh just before analysis. The flow cytometric analysis of cell DNA content was performed using an Epics XL (Coulter, Hialeah, FL). Fluorescence attributable to PI was determined using excitation by an argon laser, operating at 488 nm and at a power output of 15 mW. A minimum of 15,000 events was acquired in list mode for each sample. For each DNA histogram, the cell cycle distribution was calculated using the Multicycle Software program (Phoenix, Flow Systems, San Diego, CA).

**Immunofluorescence Analysis**– All the following steps were separated by two PBS 1X washes at room temperature. Differentiated epithelial cells were fixed in cold 4% paraformaldehyde-PBS 1X, neutralized in PBS 1X and permeabilized with 0.25 % Triton X-100-PBS 1X. The rabbit polyclonal anti-β-catenin was applied at 1:100 dilution over night at 4°C. Preparations were washed three times in blocking buffer (5 % goat serum PBS 1X ) and incubated at 1:200 dilution with goat anti-rabbit FITC conjugated antibodies (P.A.R.I.S Biotech) in blocking buffer for 2 hours at room temperature. Cells were finally mounted in VECTASHEIL Hard-Set™ mounting medium with DAPI (AbCys, Paris, France) and examined with a Zeiss Axiovert microscope equipped with epillumination.

**Statistical Analysis**– Statistical comparisons were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc pairwise comparisons with a Fisher's probability of at least significant difference (PLSD) test. Values of  $p < 0.01$  were considered significant and are presented in the results section.

## ACKNOWLEDGEMENTS

\*The authors are very grateful to the PCEM lab members for helpful discussion and critical reading of the manuscript. We thank Prof. J.R. Drevet (UMR CNRS 6547/Université Blaise Pascal, France) and Prof. P. Verelle (Unité de Radiobiologie, Centre Jean-Perrin, France) for the generous gifts of anti-EGFR and anti-phospho-EGFR antibodies. We also thank D. Cheyvialle, J-P. Saru and A. de Haze for technical assistance and Dr. J. Chassagne for FACS facilities. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Blaise Pascal (UBP) and the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). LL and SB are recipients of a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et des Technologies (MRT).

<sup>1</sup>The abbreviations used are: AKR1B7, aldo-keto reductase 1B7; AR, androgen receptor; Cdk, cyclin-dependent kinase; CdkI, Cdk inhibitor; Diff, differentiation; DHT, dihydrotestosterone; EGF, epidermal growth factor; EGFR, EGF receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Prolif, proliferation; Rb, retinoblastoma; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; VDEC, *vas deferens* epithelial cells.

## REFERENCES

- Abreu-Martin MT, Chari A, Palladino AA, Craft NA & Sawyers CL 1999 Mitogen-activated protein kinase kinase 1 activates androgen receptor-dependent transcription and apoptosis in prostate cancer. *Mol Cell Biol* **19** 5143-5154.
- Algarte-Genin M, Cussenot O & Costa P 2004 Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur Urol* **46** 285-294; discussion 294-285.
- Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veyssiere G & Morel L 2004 Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem* **279** 14579-14586.
- Bok RA & Small EJ 2002 Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat Rev Cancer* **2** 918-926.
- Bonaccorsi L, Carloni V, Muratori M, Formigli L, Zecchi S, Forti G & Baldi E 2004 EGF receptor (EGFR) signaling promoting invasion is disrupted in androgen-sensitive prostate cancer cells by an interaction between EGFR and androgen receptor (AR). *Int J Cancer* **112** 78-86.
- Bonaccorsi L, Carloni V, Muratori M, Salvadori A, Giannini A, Carini M, Serio M, Forti G & Baldi E 2000 Androgen receptor expression in prostate carcinoma cells suppresses alpha6beta4 integrin-mediated invasive phenotype. *Endocrinology* **141** 3172-3182.
- Burnstein KL, Maiorino CA, Dai JL & Cameron DJ 1995 Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression. *Mol Cell Endocrinol* **115** 177-186.
- Busse D, Dougherty RS, Ramsey TT, Russell WE, Price JO, Flanagan WM, Shawver LK & Arteaga CL 2000 Reversible G1 arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27KIP1 independent of MAPK activity. *J Biol Chem* **275** 6987-6995.
- Byrne RL, Leung H & Neal DE 1996 Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction. *Br J Urol* **77** 627-633.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A & Pagano M 1999 SKP2 is required for ubiquitin-mediated



- degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1** 193-199.
- Cayrol C & Ducommun B 1998 Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene* **17** 2437-2444.
- Crochemore C, Michaelidis TM, Fischer D, Loeffler JP & Almeida OF 2002 Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. *Faseb J* **16** 761-770.
- Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G & Klocker H 1994 Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* **54** 5474-5478.
- Cunha GR 1996 Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate Suppl* **6** 22-25.
- Cunha GR & Donjacour AA 1989 Mesenchymal-epithelial interactions in the growth and development of the prostate. *Cancer Treat Res* **46** 159-175.
- Cunha GR, Battle E, Young P, Brody J, Donjacour A, Hayashi N & Kinbara H 1992 Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. *Epithelial Cell Biol* **1** 76-83.
- Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B & Oren M 1999 Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Embo J* **18** 3054-3063.
- Davis R, Jia D, Cinar B, Sikka SC, Moparty K, Zhau HE, Chung LW, Agrawal KC & Abdel-Mageed AB 2003 Functional androgen receptor confers sensitization of androgen-independent prostate cancer cells to anticancer therapy via caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* **309** 937-945.
- Day ML, Zhao X, Vallorosi CJ, Putzi M, Powell CT, Lin C & Day KC 1999 E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J Biol Chem* **274** 9656-9664.
- Di Cunto F, Topley G, Calautti E, Hsiao J, Ong L, Seth PK & Dotto GP 1998 Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* **280** 1069-1072.
- Dotto GP 2000 p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* **1471** M43-56.
- El-Alfy M, Luu-The V, Huang XF, Berger L, Labrie F & Pelletier G 1999 Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology* **140** 1481-1491.
- Fukuchi K, Hagiwara T, Nakamura K, Ichimura S, Tatsumi K & Gomi K 2002 Identification of the regulatory region required for ubiquitination of the cyclin kinase inhibitor, p21. *Biochem Biophys Res Commun* **293** 120-125.
- Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF, Jr. & Weber MJ 1999 Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* **59** 279-284.
- Gravina GL, Festuccia C, Angelucci A, Poletti A, Capuano D, Vicentini C, Motta M & Bologna M 2004 Long-term presence of androgens and anti-androgens modulate EGF-receptor expression and MAP-kinase phosphorylation in androgen receptor-prostate positive cancer cells. *Int J Oncol* **25** 97-104.
- Heinlein CA & Chang C 2002 Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* **23** 175-200.
- Hughes-Fulford M, Chen Y & Tjandrawinata RR 2001 Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* **22** 701-707.
- Kayampilly PP & Menon KM 2004 Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase-2 phosphorylation by dihydrotestosterone reduces follicle-stimulating hormone-mediated cyclin D2 messenger ribonucleic acid expression in rat granulosa cells. *Endocrinology* **145** 1786-1793.
- Kokontis JM, Hay N & Liao S 1998 Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27Kip1 in androgen-induced cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* **12** 941-953.
- Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Jean C & Martinez A 2004 Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 3010-3019.
- Maki CG & Howley PM 1997 Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* **17** 355-363.
- Maki CG, Huibregtse JM & Howley PM 1996 In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res* **56** 2649-2654.
- Manin M, Martinez A, Van Der Schueren B, Reynaert I & Jean C 2000 Acquisition of androgen-mediated expression of mouse vas deferens protein (MVDP) gene in cultured epithelial cells and in vas deferens during postnatal development. *J Androl* **21** 641-650.
- Manin M, Veyssiere G, Cheyvalier D, Chevalier M, Lecher P & Jean C 1992 In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* **131** 2378-2386.
- Manin M, Baron S, Goossens K, Beaudoin C, Jean C, Veyssiere G, Verhoeven G & Morel L 2002 Androgen receptor expression is regulated by





the PI3- kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J* **366** 729-736.

Mansbridge JN, Knuchel R, Knapp AM & Sutherland RM 1992 Importance of tyrosine phosphatases in the effects of cell-cell contact and microenvironments on EGF-stimulated tyrosine phosphorylation. *J Cell Physiol* **151** 433-442.

Martinez ED & Danielsen M 2002 Loss of androgen receptor transcriptional activity at the G(1)/S transition. *J Biol Chem* **277** 29719-29729.

Mizokami A, Saiga H, Matsui T, Mita T & Sugita A 1992 Regulation of androgen receptor by androgen and epidermal growth factor in a human prostatic cancer cell line, LNCaP. *Endocrinol Jpn* **39** 235-243.

Motti ML, Califano D, Baldassarre G, Celetti A, Merolla F, Forzati F, Napolitano M, Tavernise B, Fusco A & Viglietto G 2005 Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas. *Carcinogenesis* **26** 1021-1034.

Myers RB, Oelschlager D, Manne U, Coan PN, Weiss H & Grizzle WE 1999 Androgenic regulation of growth factor and growth factor receptor expression in the CWR22 model of prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* **82** 424-429.

Oka H, Chatani Y, Kohno M, Kawakita M & Ogawa O 2005 Constitutive activation of the 41- and 43-kDa mitogen-activated protein (MAP) kinases in the progression of prostate cancer to an androgen-independent state. *Int J Urol* **12** 899-905.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF & Rolfe M 1995 Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269** 682-685.

Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H & Cato AC 1999 Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* **18** 6322-6329.

Petre-Draviam CE, Williams EB, Burd CJ, Gladden A, Moghadam H, Meller J, Diehl JA & Knudsen KE 2005 A central domain of cyclin D1 mediates nuclear receptor corepressor activity. *Oncogene* **24** 431-444.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM & Koff A 1994 p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8** 9-22.

Prins GS, Birch L & Greene GL 1991 Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* **129** 3187-3199.

Rizzino A, Kazakoff P, Ruff E, Kuszynski C & Nebelsick J 1988 Regulatory effects of cell density on the binding of transforming growth factor beta, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor. *Cancer Res* **48** 4266-4271.

Roovers K & Assoian RK 2000 Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* **22** 818-826.

Rousseau D, Cannella D, Boulaire J, Fitzgerald P, Fotadar A & Fotadar R 1999 Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* **18** 3290-3302.

Saifudeen Z, Dipp S & El-Dahr SS 2002 A role for p53 in terminal epithelial cell differentiation. *J Clin Invest* **109** 1021-1030.

Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM & Clurman BE 2000 Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* **5** 403-410.

Shenk JL, Fisher CJ, Chen SY, Zhou XF, Tillman K & Shemshedini L 2001 p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol Chem* **276** 38472-38479.

Sorby M & Ostman A 1996 Protein-tyrosine phosphatase-mediated decrease of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation in high cell density cultures. *J Biol Chem* **271** 10963-10966.

St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM & Kerbel RS 1998 E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol* **142** 557-571.

Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U & Krek W 1999 p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* **1** 207-214.

Takahashi K & Suzuki K 1996 Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp Cell Res* **226** 214-222.

Taneja SS, Ha S, Swenson NK, Huang HY, Lee P, Melamed J, Shapiro E, Garabedian MJ & Logan SK 2005 Cell-specific regulation of androgen receptor phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* **280** 40916-40924.

Torring N, Dagnaes-Hansen F, Sorensen BS, Nexø E & Hynes NE 2003 ErbB1 and prostate cancer: ErbB1 activity is essential for androgen-induced proliferation and protection from the apoptotic effects of LY294002. *Prostate* **56** 142-149.

Toyoshima H & Hunter T 1994 p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78** 67-74.

Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H & Zhang H 1999 p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* **9** 661-664.

Vinals F & Pouyssegur J 1999 Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by



inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol* **19** 2763-2772.

Wien KM, Toombs AR & Zhang XW 2004 Androgen inhibition of MAP kinase pathway and Elk-1 activation in proliferating osteoblasts. *J Mol Endocrinol* **32** 209-226.

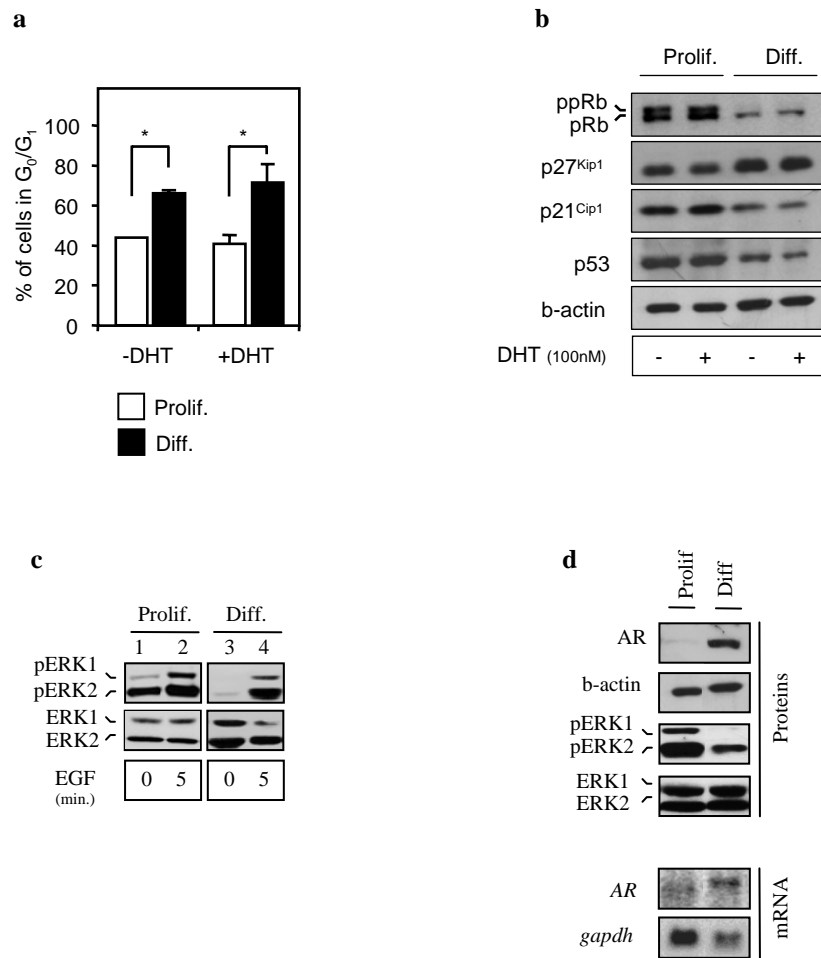
Wolf DA, Herzinger T, Hermeking H, Blaschke D & Horz W 1993 Transcriptional and

posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol* **7** 924-936.

Yamaguchi M, Hirose F, Inoue YH, Ohno K, Yoshida H, Hayashi Y, Deak P & Matsukage A 2004 Genetic link between p53 and genes required for formation of the zonula adherens junction. *Cancer Sci* **95** 436-441.



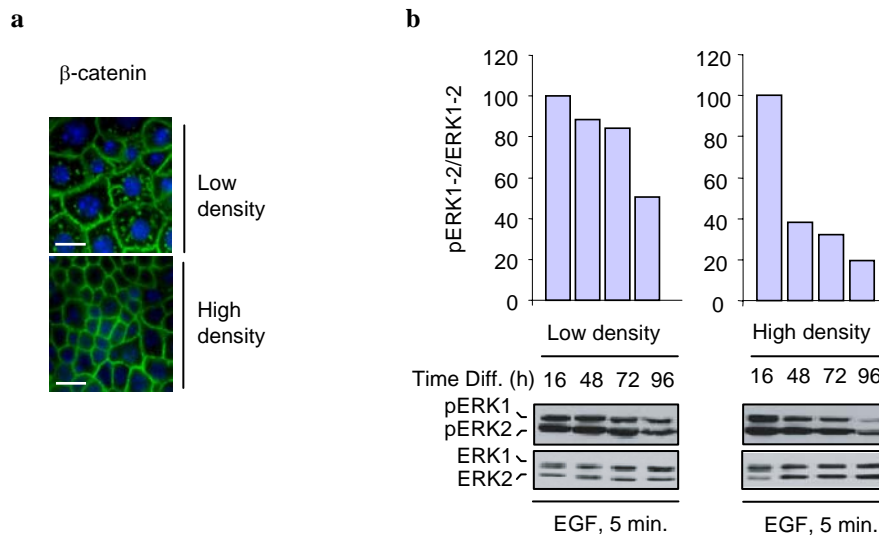
**Figure 1, Léotoing *et al.***



**FIG. 1. Increased androgen responsiveness in differentiated VDEC is correlated with cell cycle arrest.** Cells either in proliferation (Prol.) or grown to differentiation (Diff.) were cultured in medium containing EGF supplemented or not with 100nM DHT. To test the MAPK response to growth-factors stimulation, EGF was added for 5 min. just before harvest. **a**, Differentiation promotes G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> growth arrest. Cell population in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> in control (left) or DHT-treated (right) VDEC was analysed by FACS. Distribution of proliferating (open bars) and differentiated (black bars) are indicated. **b**, Differentiation alters Rb, p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup> and p53 expression. Protein samples were analysed by western blot and  $\beta$ -actin was used as a control. **c**, Basal and EGF-stimulated MAPK activities are decreased during the differentiation process. Cell lysates were analysed by western blot using anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibodies. **d**, Androgen receptor expression is enhanced in differentiated cells at both the mRNA and protein levels. Protein samples were analysed by western blot (upper panels) using anti-AR, anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibodies and total RNA was subjected to northern analysis with AR and *gapdh* (control) cDNA probes (lower panels). Results are representative of at least three independent experiments and statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Fisher *t* test (\*;  $p < 0.01$ ).



**Figure 2, Léotoing *et al.***

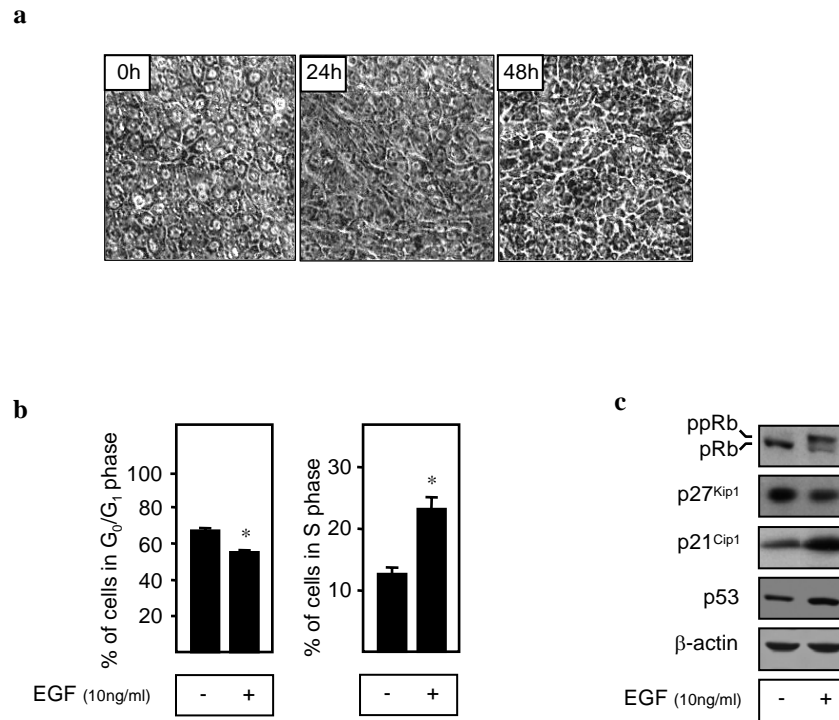


**FIG. 2. Differentiation reduces MAPK activity and continuous EGF exposure triggers morphological changes and modulates ERK1/2 sensitivity to EGF.** *a*, EGF-supplemented medium promotes high-density cultures and  $\beta$ -catenin signaling inhibition. VDEC cells were seeded onto matrigel-coated microporous membranes as described in “*Materials and Methods*” in the absence (low density) or presence (high density) of EGF for 3 days and then immunostained with rabbit anti- $\beta$ -catenin polyclonal antibody and goat anti-rabbit FITC conjugated secondary antibody. Scale bars: 20  $\mu$ m. *b*, MAPK activity in response to EGF decreases over the differentiation process as a function of cell density. Differentiating VDEC grown in low density conditions (left panel) or in high density conditions (right panel), were incubated for 3 hours in minimum medium and then stimulated for 5 min with 10 ng/ml EGF. Total lysates prepared from cells harvested 16, 48, 72 and 96 h after seeding were subjected to immunoblot analysis with antibodies to phosphorylated ERK1/2, total ERK1/2. The data are representative of two independent experiments.





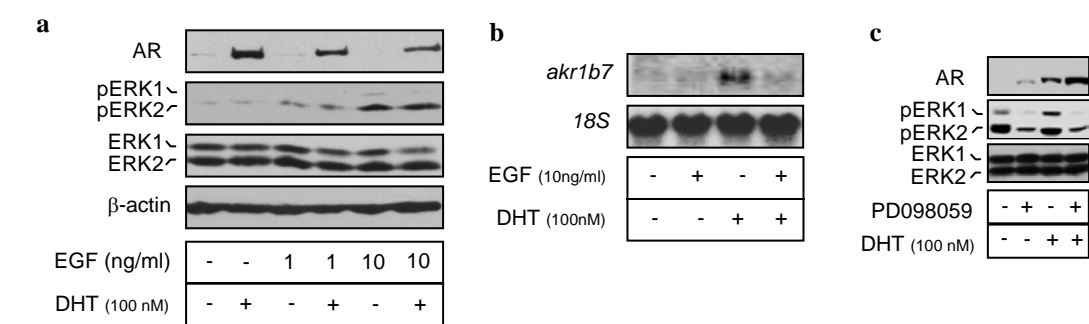
**Figure 3, Léotoing *et al.***



**FIG. 3. EGF reverses cell cycle G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest in low density differentiated cells** *a*, Morphological changes in the low density differentiated cell monolayer following EGF treatment (10 ng/ml). *b*, Cell cycle status. Parallel cell samples were trypsinized after 24 h and prepared for flow cytometric analysis of cell cycle distribution. *c*, Cell cycle regulators expression. Cells were lysed and then 40 µg were subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose and immunoblots were analysed with anti-Rb, anti-p27<sup>Kip1</sup>, anti-p21<sup>Cip1</sup> and anti-p53 antibodies. The data shown are representative of at least three independent experiments and groups with significant difference *vs* untreated control (\*; *p*<0,01) were shown.



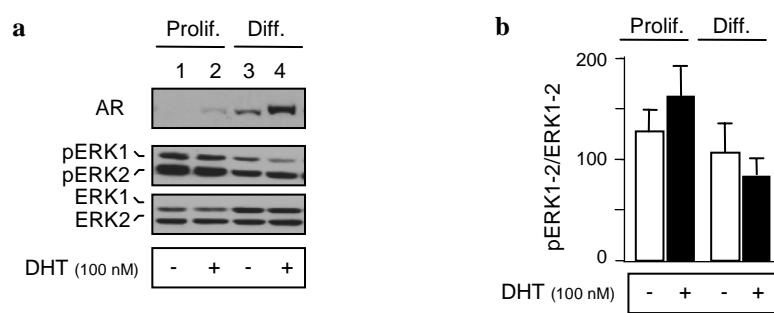
**Figure 4, Léotoing et al.**



**A. FIG. 4. EGF-induced re-entry into the cell cycle down-regulates AR signaling via activation of the MAPK pathway** *a*, AR is down-regulated while pERK1/2 is accumulated in response to increasing concentrations of EGF. VDEC were incubated with 1 and 10 ng/ml EGF for 24 h in the presence or the absence of DHT (100nM), then harvested and pERK1/2, ERK1/2 and AR expression levels were evaluated by immunoblotting using β-actin as a standard. *b*, Blockade of AR-dependent transcription by EGF. Total RNA was prepared from cells treated as in *a* and subjected to Northern blot analysis with <sup>32</sup>P-labeled cDNA probe specific for *akr1b7* mRNA using 18S as a loading control. *c*, Inactivation of the MAPK promotes AR expression : differentiated VDEC were treated as indicated in the presence or absence of 20 μM of the MEK1 inhibitor PD098059. After 16 h, total lysates were harvested and protein samples were subjected to immunoblot analysis with antibodies to AR, phosphorylated ERK1/2 and total ERK1/2.



**Figure 5, Léotoing *et al.***

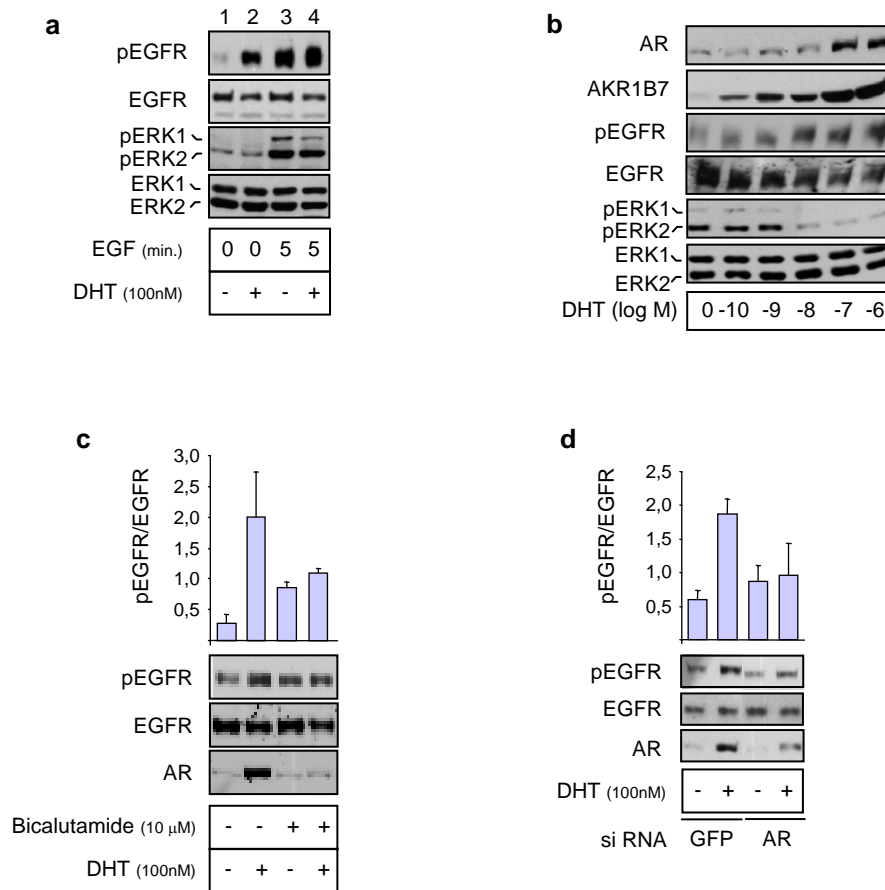


**FIG. 5. Androgens reduce MAPK activities in differentiated cells**

**a**, DHT down-regulates pERK1/2 levels in VDEC. Cells cultured in medium supplemented with EGF were either in proliferation or allowed to differentiate in the absence or the presence of DHT. ERK activity was analysed following a 5 min EGF stimulation. Cell lysates were analyzed by western blotting for AR, pERK1/2 and ERK1/2. **b**, Histograms are representative of the data reported from three independent experiments.



**Figure 6, Léotoing *et al.***



**FIG. 6. Androgens modulate EGFR phosphorylation levels.**

**a.** Androgens increase EGFR phosphorylation. VDEC induced to differentiate in low density conditions were cultured for 48 hours in the presence or in the absence of 100nM DHT before being stimulated or not for 5min with 10ng/ml EGF. **b.** Phosphorylation of EGFR is a function of androgens concentration. VDEC were allowed to differentiate in medium containing 1ng/ml EGF in the presence of increasing concentrations of DHT for 48 hours. **d.** Bicalutamide suppresses EGFR phosphorylation. VDEC were differentiated for 48 hours in EGF-containing medium with 10 nM DHT in the presence or the absence of bicalutamide (5 μM). They were then cultured in the same conditions for additional 24 hours with fresh medium before lysis. **e.** VDEC differentiated in EGF-containing medium containing 1ng/ml EGF were transfected with AR siRNA and then cultured in medium supplemented or not with 10nM DHT for 48 hours. It was changed every 24 hours for fresh medium. For all these experiments, cell lysates were subjected directly to immunoblot analysis with antibodies to phosphorylated EGFR (Tyr1173), total EGFR, phosphorylated ERK1/2, total ERK1/2, AR and AKR1B7. The quantified data are representative of three independent experiments.





# Androgen Receptor Mediates Non-genomic Activation of Phosphatidylinositol 3-OH Kinase in Androgen-sensitive Epithelial Cells\*

Received for publication, June 11, 2003, and in revised form, December 9, 2003  
Published, JBC Papers in Press, December 10, 2003, DOI 10.1074/jbc.M306143200

Silvère Baron‡, Michèle Manin, Claude Beaudoin, Laurent Leotoing‡, Yves Communal§, Georges Veyssiere, and Laurent Morel¶

From the *Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, UMR 6547 CNRS-Université Blaise Pascal, Campus universitaire des Cèzeaux, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex* and the *§Laboratoire d'Immunologie, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France*

Androgens are known to modulate many cellular processes such as cell growth and survival by binding to the androgen receptor (AR) and activating the transcription of target genes. Recent data suggested that AR can also mediate non-transcriptional actions outside the nucleus in addition to its ligand-inducible transcription factor function. Here, we describe a transcription-independent activation of the phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3-K) signaling pathway by androgens. Using non-transformed androgen-sensitive epithelial cells, we show that androgens enhance the PI3-K activity by promoting accumulation of phosphoinositide-3-P phospholipids *in vitro*. This activation is found in conjunction with an increased time-dependent phosphorylation of the downstream kinase AKT/protein kinase B on both Ser<sup>473</sup> and Thr<sup>308</sup> residues. Hormone-stimulated phosphorylation of AKT requires AR since incubation with the anti-androgen bicalutamide completely abolishes the androgen-stimulated AKT phosphorylation. Accordingly, we show that androgens increase AKT phosphorylation level in prostatic carcinoma PC3 cells only once they have been transfected with AR. Downstream, androgens enhance phosphorylation of transcription factor FKHR (Forkhead in rhabdomyosarcoma)-L1 and proapoptotic Bad protein and promote cell survival as they can counteract an apoptotic process. We also report that non-genomic effects of androgens are based on direct interaction between AR and the p85 $\alpha$  regulatory subunit of class I(A) PI3-K. Together, these novel findings point out an important and physiologically relevant link between androgens and the PI3-K/AKT signaling pathway in governing cell survival.

Steroid hormones exert most of their effects by binding to specific nuclear receptors, which act as transcription factors (1–3). The relationship between steroid target genes and steroid physiological actions suggest that mechanisms, different from those controlling the transcriptional activity of nuclear receptors, may be involved. In recent years, steroids have been

found to control the activity of multiple signaling pathways via non-genomic mechanisms (for a review, see Ref. 4). Non-genomic activities of estrogen receptor (ER)<sup>1</sup> were the first described and associated to vascular protection through nitric oxide production in endothelial cells, involving the phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3-K) and subsequent endothelial nitric-oxide synthase activation (5–8). Estrogens and both ER $\alpha$  and ER $\beta$  rapid effects have been studied in a wide range of physiological or pathological conditions and cell types, including neurons (9), endothelial cells, osteoblasts, and breast cancer cells (10). Some other steroid receptors such as progesterone receptor (PR) (11–14) but also androgen receptor (AR) (15–17) have been recently highlighted to mediate non-genomic activities. Kousteni *et al.* (17) demonstrated that ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR, associated in the same complex, can protect osteoblasts and osteocytes from apoptosis through the Src/Shc/ERK signaling pathway. Moreover, such association of either AR with ER $\beta$  in LNCaP cells or AR with ER $\alpha$  in MCF-7 and T47-D cell lines was described to trigger cell proliferation through the same pathway (16). In PC3 cells stably expressing AR, androgens are able to increase the enzymatic activities of several cytoplasmic kinases such as the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), the protein kinase C, and the PI3-K (15). Although non-genomic steroid receptor activities mediated by the PI3-K pathway are now well documented for ER and PR, they remain poorly investigated concerning AR.

Three classes of PI3-K have been described depending on their primary structure and substrate specificity (18, 19). Class I(A) comprises five adapter subunits currently known. Of these, three are encoded by the p85 $\alpha$  gene, generating p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , and p50 $\alpha$  by alternative splicing. These regulatory subunits regulate catalytic subunits p110 $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\delta$ , which enhance phosphorylation of phosphoinositides (PtdIns-P) in D3 position of the inositol ring (20). The class I(A) p85 $\alpha$ /p110 $\alpha$  heterodimer, the most studied PI3-K, supports a large number of insulin and growth factor cellular effects (21–24). *In vivo*, the main phosphorylated lipids generated by PI3-K class I(A) are the PtdIns-3,4-P<sub>3</sub> and PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>, which in turn recruit signaling kinases such as the AKT/protein kinase B (25). Acti-

\*This work was supported by grants awarded by CNRS, the Université Blaise Pascal, and the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate, France. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipients of a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et des Technologies.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-473407756; Fax: 33-473407042; E-mail: laurent.morel@univ-bpclermont.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ER, estrogen receptor; AR, androgen receptor(s); PR, progesterone receptor; PI3-K, phosphatidylinositol 3-OH kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ANOVA, analysis of variance; PARP, poly-ADP ribosyl polymerase; VDEC, vas deferens epithelial cells; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PBS, phosphate-buffered saline; GST, glutathione S-transferase; CHX, cycloheximide; IGF-I, insulin-like growth factor-I; PtdIns, phosphoinositides; P, phosphorylated; h, human; FKHR, Forkhead in rhabdomyosarcoma.



vation of AKT by phosphorylation of the Ser<sup>473</sup> and Thr<sup>308</sup> residues (26) mediates many of the downstream PI3-K effects, including protection against apoptosis. This control involves the phosphorylation of many proteins, including the transcription factor of the Forkhead family (FKHR) (27) and the proapoptotic factor Bad (28, 29).

In this study, we report that androgens can activate PI3-K in androgen-sensitive epithelial cells. The PI3-K activation results in the phosphorylation of the downstream AKT/protein kinase B, FKHR-L1, and Bad protein and is supported by direct interactions between AR and p85 $\alpha$ , involving the N-terminal SH3 and C-terminal SH2 domains of the regulatory subunit. Finally, we demonstrate that androgenic activation of the PI3-K/AKT pathway by AR acts as a anti-apoptotic stimulus in epithelial cells.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents**—R1881, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and Wortmannin were obtained from Sigma. LY294002 was purchased from Biomol, and Bicalutamide (Casodex®) was purchased from Astra-Zeneca. Antibodies against PI3-K subunit p85 $\alpha$  (catalog number 06-195) and AR (catalog number PG21) were from Upstate Biotechnology; AKT (catalog number 9272), phospho-AKT Ser<sup>473</sup> (catalog number 9271), phospho-AKT Thr<sup>308</sup> (catalog number 9275), phospho-Bad Ser<sup>112</sup> (catalog number 9296), and phospho-FKHR-L1 Ser<sup>256</sup> (catalog number 9461) were from Cell Signaling; poly-ADP ribosyl polymerase (PARP) (catalog number C2-10) was from Trevigen Inc.; and  $\beta$ -actin (catalog number A2066) was from Sigma.

**Cell Culture and Transfections**—Mouse vas deferens epithelial cells (VDEC) were cultured as already described (30). Cells were starved for 16 h in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham F12, gentamycin (50  $\mu$ g/ml) and then stimulated with or without R1881 or IGF-I. When used, LY294002 or Wortmannin were added 30 min before hormone inductions and were maintained through the experimental procedure. PC3 cells were grown in Glutamax-Dulbecco's modified Eagle's medium containing gentamycin (50  $\mu$ g/ml) and 10% fetal calf serum. Cells were transfected using the PEI Exgen 500 procedure (Euromedex).

**Plasmids and Constructions**—The pSG5-hAR and pGEX4T1-p85 $\alpha$  plasmids were kindly provided by Prof. C. Sultan (Montpellier, France) and Dr. B. Payrastré (Toulouse, France), respectively. The p85 $\alpha$  expression vector was constructed into the NcoI and EcoRI sites of pTRAK by subcloning the full-length p85 $\alpha$  PCR fragment amplified from pGEX4T1-p85 $\alpha$  using the upstream 5'-CATGCCATGGTTGCTAGGGG-GTACCAGT-3' and the downstream 5'-CCGGAATTCCGGTCATCGC-CTCTGCTGTG-3' primers. The SH3, BCR, N-SH2, and C-SH2 domains of p85 $\alpha$  were obtained by reverse transcriptase-PCR and then subcloned into the pGEM-Teasy vector (Promega). BamHI/EcoRI restriction fragments were further ligated into the pGEX-4T1 expression vector (Amersham Biosciences) in-frame with the open reading frame of GST using the following primer pairs: 5'-CGCGGATCCGCGATGAGT-GCTGAGGGGTAC-3', 5'-AGGGGGCCCCCTTTTCCTTCCAATATAT-TCTACGTAAGTTC-3'; 5'-CGCGGATCCGCGAATAATCTTCGCTCC-ACACCAAAG-3', 5'-AGGGGGCCCCCTGTTGTTGGCTACAGTAGTA-GGTTTTTG-3'; 5'-CGCGGATCCGCGGGTATGAATAACAATATGTC-CTTACA-3', 5'-AGGGGGCCCCCTATATTCTTCATATAATCTATCAT-ATTCTCG-3'; 5'-CGCGGATCCGCGACGAGAGACCAATCTTGATG-TGG-3', 5'-AGGGGGCCCCCTTCGCTCTGCTGTGCATATACT-3'. The GST-hAR expression vectors were constructed by ligating the full-length hAR and its N-terminal, C-terminal, and DNA binding domain-hinge domains into the pGEX-3X or pGEX-4T1 expression vectors using the BamHI/EcoRI- or BamHI/XhoI-digested fragments generated by PCR using the following oligonucleotides: 5'-CGCGGATCCGCGATGG-AAGTGCAGTTAGGGC-3', 5'-GATCCTCGAGTCCAATGCTTCACTG-GGTGTG-3'; 5'-CGCGGATCCGCGATGGAGTGCAGTTAGGGC-3', 5'-GATCCTCGAGCATGTCCCCGTAAGGTCCGGA-3'; 5'-AGCGGAT-CCGACCTTACGGGGACATG-3', 5'-AGCGAATTCAGAAAGATGGG-CTGACA-3'; 5'-GATCGGATCCTGTGACCCCATCTTTCTGAATGTC-3', 5'-GATCCTCGAGTCCAATGCTTCATCGGTGTG-3'.

**PI3-K Assay**—Cells were starved 16 h in minimum medium before the addition of hormones and/or pharmacological inhibitors. After the indicated periods, cells were lysed in ice-cold buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM NaF, 1% Nonidet P-40, 0.5 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin) and centrifuged at 12,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-p85 $\alpha$  antibodies (06-195)

and protein A-Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences) for 2 h at 4 °C. Beads were washed twice with buffer A (PBS 1 $\times$ , Nonidet P-40 0.1%), twice with buffer B (Tris 100 mM, LiCl 100 mM), and twice with buffer C (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM). Beads were resuspended in reaction buffer (20 mM Hepes, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), and phosphorylation assays were performed in the presence of 200  $\mu$ g of phosphatidylinositol, 5 mM Hepes, 250  $\mu$ M ATP, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP for 15 min at room temperature. The reactions were blocked by the addition of 4 N HCl, and the phospholipids were extracted with CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1). Lower phases were dried and resuspended in CHCl<sub>3</sub> and analyzed by TLC using CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O (90:70:6:14). The phosphorylated lipids were visualized by autoradiography and quantified using a phosphorimaging device (Bio-Rad).

**Western Blot Analysis**—Cells were harvested, washed in ice-cold PBS buffer, and lysed in radioimmune precipitation buffer (50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin). Total proteins (40  $\mu$ g) were boiled in Laemmli sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Biosciences) followed by blocking in Tris-buffered saline 1 $\times$ , 10% powdered milk, and incubated with the indicated primary antibodies in the same buffer overnight at 4 °C. The membranes were washed three times with 1 $\times$  Tris-buffered saline, 0.05% Tween 20, and then incubated 1 h with either anti-rabbit (P.A.R.I.S) or anti-mouse (Amersham Biosciences) peroxidase-conjugated IgG. Detection was performed using ECL system (PerkinElmer Life Sciences).

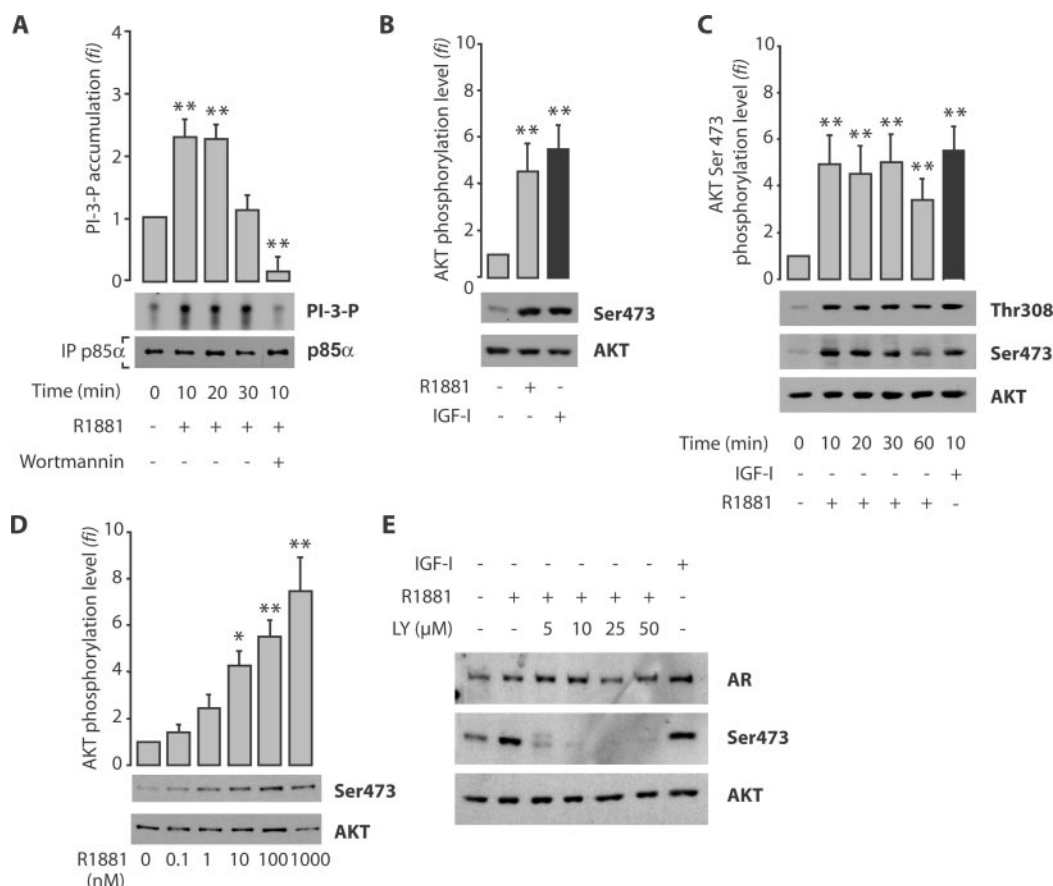
**GST Pull-down Experiments**—Fresh overnight cultures of BL21 pLysS *Escherichia coli* strain transformed with GST-fused constructs were diluted 1:10 in LB medium containing ampicillin (100  $\mu$ g/ml). Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside was added in growing exponential bacterial culture to a final concentration of 1 mM and incubated for 4 h at 30 °C. Cells were resuspended in STE buffer (10 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). After 10,000  $\times$  g centrifugation during 10 min at 4 °C, pellets were frozen during 5 min, resuspended in STE buffer containing 1 M dithiothreitol and 10% sarcosyl. Lysates were sonicated for 1 min and clarified at 10,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C. The bacterial supernatant was rocked overnight at 4 °C with glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences), and beads were washed three times with PBS containing Triton X-100 (0.1%) and PMSF (1 mM). <sup>35</sup>S-labeled AR and p85 $\alpha$  proteins were generated *in vitro* using the TNT T7/T3-coupled reticulocyte lysate system (Promega). <sup>35</sup>S-labeled proteins were incubated with the beads in binding buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 mg of bovine serum albumin, 2 mM dithiothreitol, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 1  $\mu$ g/ml aprotinin) by rocking 2 h at 4 °C. The glutathione-Sepharose beads were then washed six times in PBS buffer containing 0.2% Triton X-100 and 150 mM NaCl, resuspended in Laemmli buffer, released from beads by boiling for 5 min, and subjected to SDS-PAGE analysis. Fractionated proteins were stained with Coomassie Blue, visualized by autoradiography, and quantified using a phosphorimaging device (Bio-Rad).

**Immunoprecipitation**—VDEC were washed with PBS and lysed in ice-cold radioimmune precipitation buffer. Cell lysates were centrifuged, and 500  $\mu$ g of total protein was subjected to immunoprecipitation using anti-p85 $\alpha$  antibodies (06-195) and protein A-Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences) overnight at 4 °C. After five washes with PBS buffer, 0.2% Triton X-100 and 150 mM NaCl, the immunocomplexes were eluted in Laemmli buffer and analyzed by Western blotting as described above.

**Apoptosis**—Following treatment, the VDEC monolayer was fixed with Clarke buffer (CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH 3:1) at 4 °C for 10 min, and nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma) for 30 min in the dark at room temperature. Cells were analyzed for the appearance of pyknotic nuclei and apoptotic body formation using a Zeiss Axioplan microscope. For flow cytometry analysis, cells were recovered and washed in PBS. Pellets were resuspended in an RNase A (500  $\mu$ g/ml), propidium iodide (50  $\mu$ g/ml) solution and kept 1 h at 4 °C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter fluorescence-activated cell sorter. The percentage of apoptotic cells was determined by evaluating sub-G<sub>1</sub> nuclei accumulation. At less 15,000 events were measured for each sample.

**Statistical Analysis**—Statistical analyses were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher *t* test. Values of *p* < 0.01 were considered significant and are presented under "Results."





**FIG. 1. Androgens activate the PI3-K/AKT pathway.** As shown in *A*, PI3-K activity is enhanced by androgens. VDEC were starved for 16 h before R1881 treatment (10 nM) with or without wortmannin (20 nM), and PtdIns-3-P (*PI-3-P*) accumulation was measured after 10-, 20-, and 30-min inductions. Total cell lysates were immunoprecipitated (*IP*) by anti-p85 $\alpha$  antibody, and the immune complexes were subjected to lipid kinase assay or Western blotting. *B*, AKT phosphorylation by androgens. After 20 min of R1881 (10 nM) treatment or 10 min of IGF-I (50 ng/ml) treatment, total proteins were analyzed by Western blotting with anti-phospho-AKT Ser<sup>473</sup> or anti-total AKT antibodies. As shown in *C* and *D*, AKT is phosphorylated on both Ser<sup>473</sup> and Thr<sup>308</sup> residues. AKT is phosphorylated in a time- and dose-dependent manner by androgens. After the indicated periods of time, R1881-treated cells (10 nM) were harvested, and total proteins were analyzed by Western blotting with anti-phospho-AKT Ser<sup>473</sup>, anti-phospho-AKT Thr<sup>308</sup>, or anti-total AKT antibodies. As shown in *E*, AKT phosphorylation by androgens is inhibited by LY294002 (5–50  $\mu$ M). After 16 h of starvation, the VDEC were treated with increasing concentrations of LY294002 before R1881 treatment (10 nM). After 20 min, total lysates were analyzed by Western blotting with anti-AR, anti-phospho-AKT Ser<sup>473</sup>, or anti-total AKT antibodies. As a reference, cells were incubated for 10 min with IGF-I (50 ng/ml). Data are means  $\pm$  S.D. (*A*, *n* = 5; *B*, *D*, and *E*, *n* = 3). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Fisher *t* test (\*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.01).

## RESULTS

**Androgens Stimulate the PI3-K/AKT Pathway in Androgen-sensitive Epithelial Cells**—The ability of androgens to enhance the PI3-K activity in non-tumoral VDEC that express endogenous AR was tested using R1881. The PI3-K p85 $\alpha$  regulatory subunit was immunoprecipitated, and the phosphorylation status of the PI3-K substrates (PtdIns-3-P versus PtdIns) was assessed by thin layer chromatography. A 10–20-min exposure of VDEC with R1881 was associated with a 2.3-fold increase in the PI3-P production *in vitro* (Fig. 1*A*). This lipid kinase activity is dependent on the PI3-K as it was inhibited by wortmannin, an inhibitor of the p110 catalytic subunit of the PI3-K (31). The activation of the lipid kinase activity in response to this short androgenic stimulation was unlikely to be related to modifications in the steady-state levels of p85 $\alpha$  and AR as they remained unchanged during the treatment (data not shown).

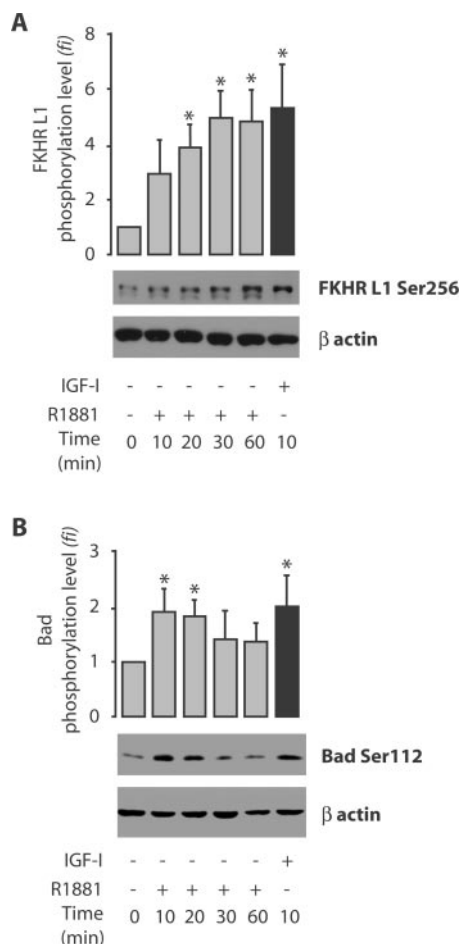
PI3-K catalyzes the formation of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> on the intracellular membrane surface and leads to the recruitment of pleckstrin homology-containing domain proteins within the cell. Among these is the Ser/Thr kinase AKT, which mediates a large range of the PI3-K cellular effects. To determine whether androgens can activate AKT, we monitored its phosphorylation status on the Ser<sup>473</sup> residue, known to be regulated in a PI3-K-dependent manner by growth factors. A 20-min incubation

with R1881 resulted in a 4.6-phosphorylation fold increase, similar to that obtained under IGF-I exposure (Fig. 1*B*). Nevertheless, full AKT activation is dependent on the phosphorylation of two specific sites, Ser<sup>473</sup> in the COOH regulatory region but also Thr<sup>308</sup> in the kinase domain. We thus tested the capacity of androgens to change the phosphorylation status of Thr<sup>308</sup>, in addition to that of Ser<sup>473</sup>. In the presence of R1881, Thr<sup>308</sup> phosphorylation was up-regulated and reached the highest level within 10 min (Fig. 1*C*). The phosphorylation on the Ser<sup>473</sup> residue in response to androgens was time- and dose-dependent (Fig. 1, *C* and *D*). Maximum phosphorylation is observed upon 10 min and significant for 10 nM R1881. To determine whether PI3-K is required or not for AKT phosphorylation in response to androgens, the Ser<sup>473</sup> phosphorylation status was analyzed in the presence of increasing concentrations of LY294002, a PI3-K inhibitor (31). Co-incubation of VDEC with LY294002 and R1881 dramatically decreased AKT phosphorylation, even with an inhibitor concentration as low as 5  $\mu$ M (Fig. 1*E*). Previously, we have demonstrated that AR level is dependent on the PI3-K/AKT pathway and that 50  $\mu$ M LY294002 could abolish AR expression after long exposure (30). As shown in Fig. 1*E*, the use of the PI3-K inhibitor did not affect AR accumulation over a short incubation.

It was then investigated whether intracellular effectors



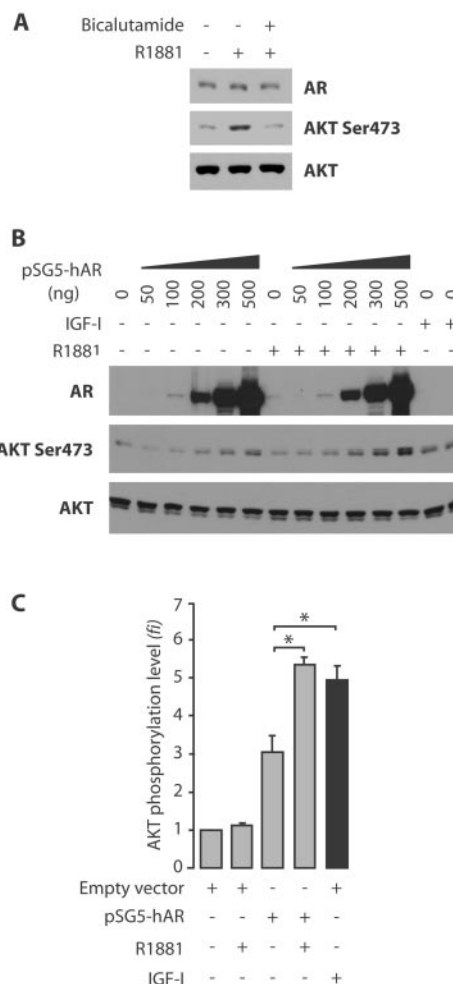




**FIG. 2. Androgen stimulation promotes downstream phosphorylation of FKHR L1 and Bad.** A and B, downstream phosphorylation of FKHR-L1 (A) and Bad (B) by androgens. Cells were treated with R1881 (10 nM) in a time-dependent manner, and total proteins were analyzed by Western blotting with anti-phospho-FKHR-L1 Ser<sup>256</sup> and anti-phospho-Bad Ser<sup>112</sup> antibodies. Sample loading was controlled by  $\beta$ -actin detection. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Fisher  $t$  test (\*,  $p < 0.01$ ).

downstream to AKT, such as the transcription factor FKHR-L1 or the pro-apoptotic factor Bad, could be phosphorylated following androgenic stimulation. These two proteins are known to be inhibited by AKT through phosphorylation of Ser<sup>256</sup> and Ser<sup>112</sup>, respectively. FKHR-L1 phosphorylation was significantly increased following a 20-min R1881 stimulation and reached its maximal level after 1 h of treatment (Fig. 2A). The Bad protein was highly and rapidly phosphorylated. Unlike FKHR-L1, the high phosphorylation level of Bad in response to androgens was transient, reaching a maximum between 10 and 20 min of treatment (Fig. 2B). Present data suggest that different mechanisms could be involved in the control of FKHR-L1 and Bad phosphorylation, even if they are a substrate of the same kinase. These observations demonstrate that androgen stimulation of AKT leads to phosphorylation of cognate substrates.

**AR Is Required for the Androgen-dependent PI3-K/AKT Pathway Stimulation**—To demonstrate whether AR is involved in the androgenic activation of the PI3-K, AKT phosphorylation on Ser<sup>473</sup> was analyzed in the presence of both R1881 and bicalutamide, a synthetic anti-androgen hormone. Bicalutamide blocked R1881-induced AKT phosphorylation (Fig. 3A), suggesting that AR is required for activation of the PI3-K/AKT pathway. This effect did not rely on changes in AR accumula-



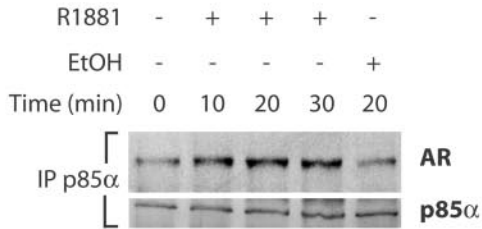
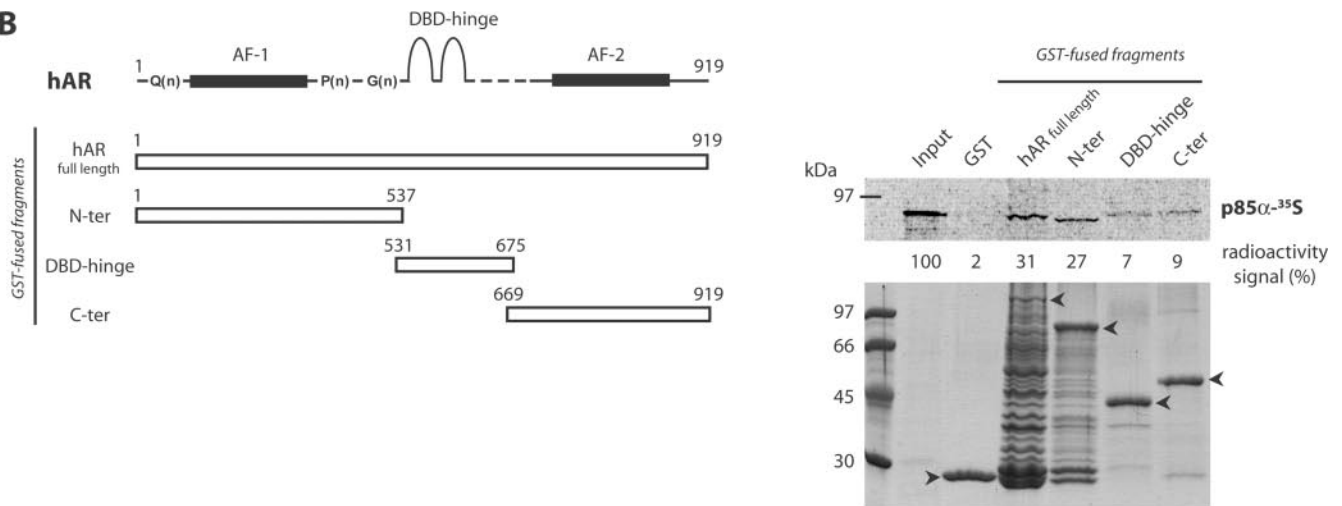
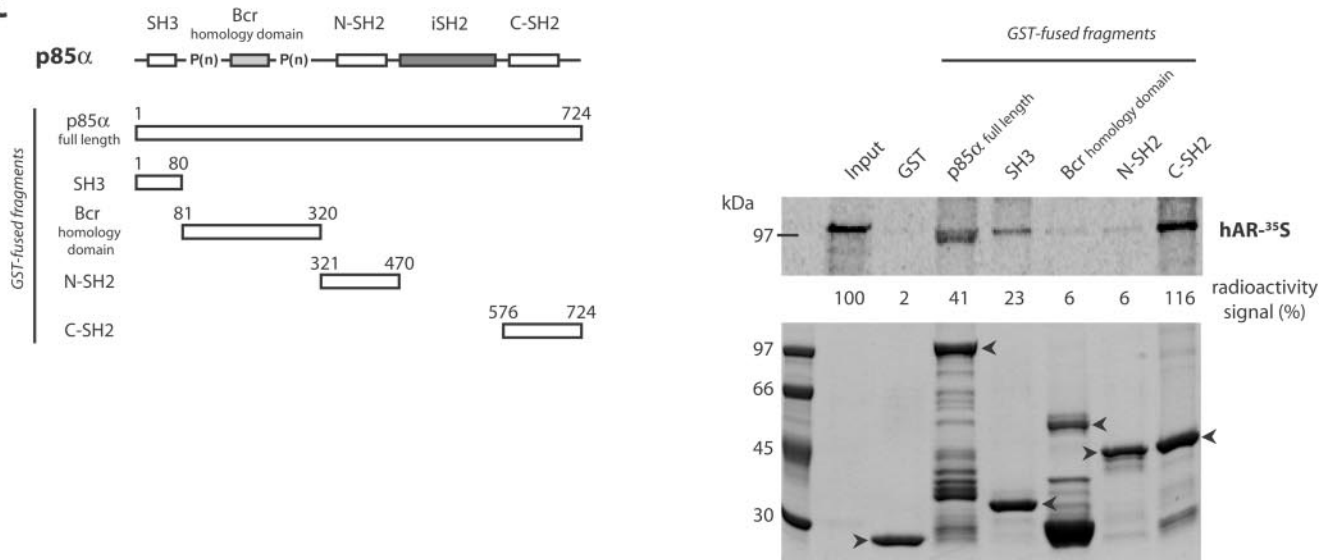
**FIG. 3. Androgen-induced AKT phosphorylation requires classical androgen receptor.** As shown in A, bicalutamide suppresses AKT phosphorylation by androgens. The VDEC were starved for 16 h before the addition of R1881 (10 nM) for 20 min or the addition of IGF-I (50 ng/ml) for 10 min in the presence or in the absence of the anti-androgen bicalutamide (1  $\mu$ M). After the indicated times, cells were lysed, and total proteins were analyzed by Western blotting with anti-AR, anti-phospho-AKT Ser<sup>473</sup>, and anti-total AKT antibodies. As shown in B, androgens stimulate AKT phosphorylation in AR-transfected cells. PC-3 cells were transiently transfected with 50–500 ng of pSG5-hAR or pSG5 empty vector followed by treatment with R1881 (10 nM) for 20 min. Cells were then lysed, and proteins were analyzed as described above. C, representative histograms of pSG5- (as shown in panel B) and pSG5-hAR (300 ng)-transfected PC-3 cells. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Fisher  $t$  test (\*,  $p < 0.01$ ) using the pSG5-hAR group as a reference.

tion since it remained at steady-state levels in the different experimental conditions. We also analyzed AKT Ser<sup>473</sup> phosphorylation in PC3 prostate carcinoma cells, which do not express endogenous AR. These cells were transfected with increasing amounts of either an AR-expressing construct or the corresponding empty vector. As shown in Fig. 3B, the increase in the phosphorylation level on the Ser<sup>473</sup> residue was dependent on the presence of the AR. In this transient transfection assay, although AR was able to mediate a partial AKT phosphorylation in untreated cells (Fig. 3C), this 3.0-fold stimulation was further enhanced when AR was activated by R1881. These results clearly indicate that androgen receptor is a central mediator for androgen action on PI3-K pathway since PC3 cells devoid of endogenous AR are unable to enhance AKT phosphorylation in response of R1881.

**The Androgen Activation of the PI3-K/AKT Pathway Is Supported by a Physical Interaction between AR and p85 $\alpha$** —Prior

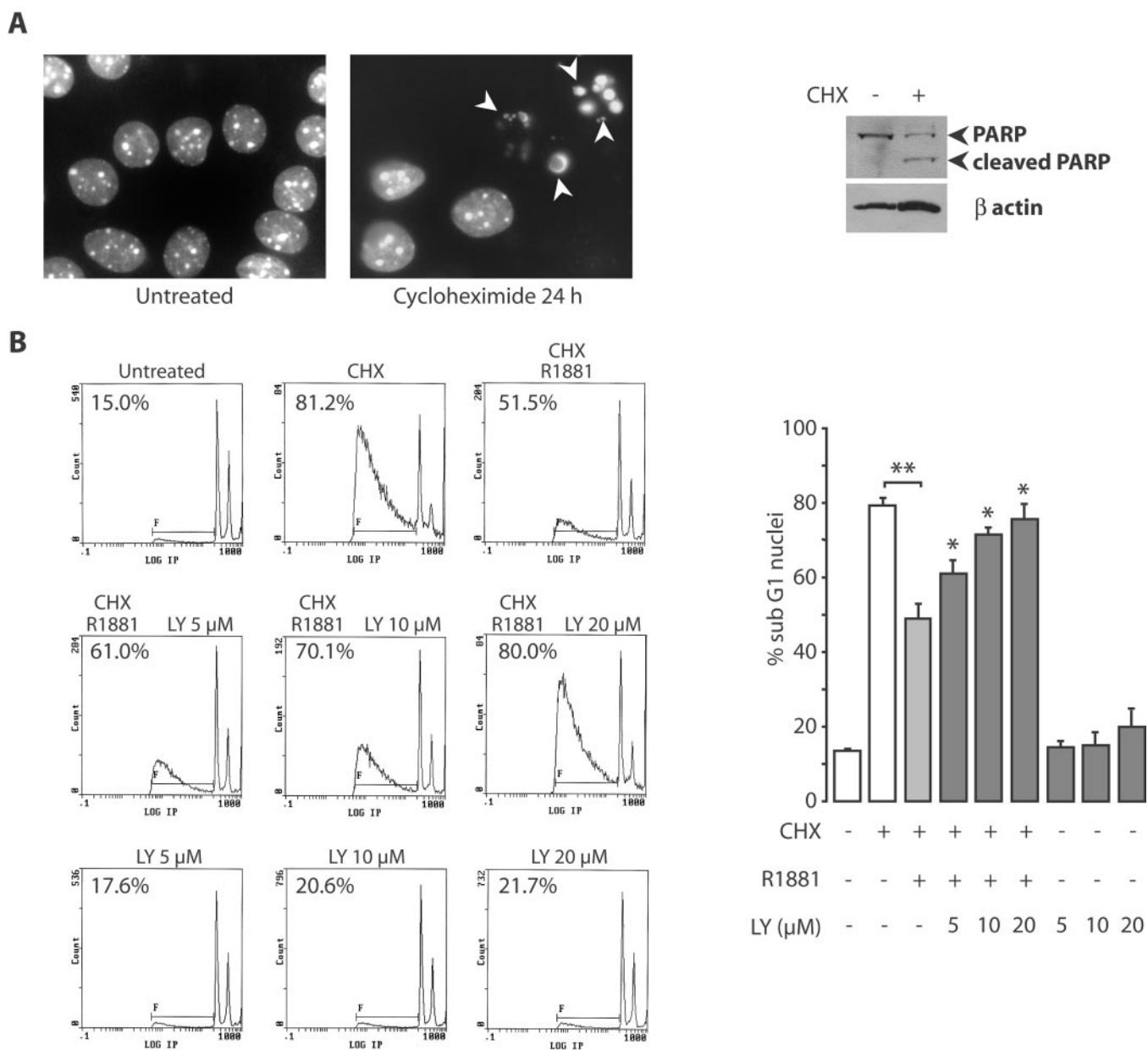




**A****B****C**

**FIG. 4. Androgen receptor interacts with the p85α regulatory subunit of PI3-K.** *A*, interaction between AR and p85α. VDEC were starved for 16 h, and then incubated with or without R1881 (10 nM) for 10, 20, and 30 min or with ethanol for 20 min as a control. Precleared cell lysates were immunoprecipitated with anti-p85α antibody, and the immune complexes were analyzed by Western blotting with anti-AR and anti-p85α antibodies. *B*, *in vitro* pull-down assay of <sup>35</sup>S-labeled p85α against full-length, N-terminal, DNA binding domain (DBD)-hinge, C-terminal domains of hAR fused to GST. *C*, *in vitro* pull-down assay of <sup>35</sup>S-labeled hAR against full-length, SH3, Bcr, N-SH2, C-SH2 domains of p85α fused to GST. The *Input* lanes were loaded with 20% of the amount of <sup>35</sup>S-labeled proteins used in the binding reactions. The amount of GST-fused recombinant proteins was monitored by Coomassie Blue staining, and radioactive signals of radiolabeled proteins were analyzed using a phosphorimaging device.





**FIG. 5. Cycloheximide-induced apoptosis is prevented by androgens through the PI3-K pathway.** **A**, CHX-induced apoptosis in VDEC. Cells were treated with or without cycloheximide (10  $\mu$ M/ml) for 24 h. The monolayer was fixed as described under "Experimental Procedures," and nuclei were stained by Hoechst 33342 (shown on the left) or subjected to PARP Western blotting (shown on the right). As shown in **B**, cells were pretreated for 48 h with R1881 (10 nM) after polarization in combination with 5, 10, or 20  $\mu$ M LY294002 or alone, and then starved for 16 h in minimum medium. Cells were incubated for 1 h in the presence of R1881 (10 nM) in combination with increasing doses of LY294002 or alone prior to the addition of CHX (10  $\mu$ M/ml) for 48 h. Cells were harvested and stained with propidium iodide, and DNA content was analyzed by flow cytometry. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), and statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Fisher  $t$  test. The CHX and CHX+R1881 groups are significantly different one from each other (\*\*,  $p < 0.01$ ), and the CHX+R1881+LY-treated groups are significantly different from the CHX+R1881 group (\*,  $p < 0.01$ ).

investigations demonstrated that some steroid receptors, such as glucocorticoid and estrogen receptors, could interact with the p85 $\alpha$  regulatory subunit of PI3-K. To determine whether such interactions can occur between p85 $\alpha$  and AR, we performed p85 $\alpha$  immunoprecipitation in VDEC. As suspected, AR was detected in the p85 $\alpha$  immune complex, and interaction is enhanced by R1881 stimulation upon 10 min (Fig. 4A). The interaction features were then investigated using GST pull-down assays. We monitored the binding of  $^{35}$ S-p85 $\alpha$  produced *in vitro* to the full-length, N-terminal domain, DNA binding domain, or ligand binding domain of AR fused to GST. All the AR truncated constructs tested bound p85 $\alpha$  protein, but the DNA binding domain-hinge and C-terminal domain exhibits

slight interactions regarding N-terminal domain (Fig. 4B). We next investigated the interaction abilities of the different p85 $\alpha$  domains to radiolabeled  $^{35}$ S-AR; only the SH3 and C-SH2 domains showed consistent binding (Fig. 4C). The binding of androgen receptor to p85 $\alpha$  *in vitro* was independent of the ligand (data not shown). Taken together, these data demonstrate that AR/p85 $\alpha$  interaction occurs throughout direct interaction involving SH3 and C-SH2 motifs of the regulatory subunit.

**Androgens Protect VDEC against Cycloheximide-induced apoptosis through PI3-K pathway**—As R1881 can stimulate the PI3-K pathway, we investigated whether this androgen-dependent non-genomic mechanism could be able to control cell



survival. To prove this hypothesis, we first determined whether the apoptotic inducer cycloheximide (CHX) triggers apoptosis in VDEC following a 24-h treatment. It resulted in monolayer injury by cells cutting off, changes in nuclei morphology with the appearance of pyknotic nuclei, and apoptotic bodies as attested by DNA staining experiments (Fig. 5A). To ensure that these observations arose from an apoptotic process, we performed Western blot analysis to monitor PARP cleavage, which is specific to the apoptotic process. As expected, CHX induced accumulation of the cleaved PARP form at 85 kDa (Fig. 5A). We then investigated androgen effects on cycloheximide-induced apoptosis and determined the percentage of apoptotic cell population by flow cytometry by measuring hypoploid nuclei accumulation. VDEC were pretreated for 48 h with R1881 (10 nM) to increase AR expression (30) and with LY294002 to prevent any non-genomic action of androgens and to ensure that the treatment could not interfere with the PI3-K cell survival pathway. Cells were then starved for 16 h in minimum medium, a treatment that did not decrease AR level but reset growth factor-dependent signaling pathways. At this point, VDEC were incubated for 1 h with R1881 in the presence or in the absence of LY294002 prior to the addition of cycloheximide to analyze the non-genomic action of androgens on apoptosis. Such an R1881 incubation was able to prevent cell death, reducing apoptotic cell population from 81 to 51% (Fig. 5B). In contrast, LY294002 co-incubation with R1881 blocked the androgen protective effects in a dose-dependent manner, when LY294002 alone had no effect. Taken together, these results indicate that R1881 supports an important role in epithelial cell survival through the non-genomic activation of PI3-K.

#### DISCUSSION

We show here that the androgen receptor is able to activate the PI3-K/AKT pathway through direct interaction with the p85 $\alpha$  regulatory subunit in response to synthetic but also to natural androgens (not shown). Such androgenic activation of the PI3-K leads to the phosphorylation of AKT and the downstream targets Bad and FKHR-L1. Since androgen withdrawal has the potential to inhibit epithelial cell growth and to induce epithelial apoptosis in the epididymis, vas deferens, seminal vesicle, and prostate, many efforts have been devoted to decipher the mechanisms by which they are able to act in these organs. Although androgens were demonstrated to act on proliferation processes through the ras/MAPK signaling cascade, their effect on the PI3-K/AKT pathway has remained little investigated until now. The PI3-K pathway is a central signaling crossroad that integrates a variety of extracellular signals and controls several cellular functions, including cytoskeletal organization, cell division, and survival maintenance (32–34). Among the proteins involved in the regulation of cell death, the transcription factors of the Forkhead family (27) and the pro-apoptotic protein Bad (28, 29), a member of the Bcl-X family, are the key targets of the PI3-K/AKT pathway. Using differentiated androgen-sensitive epithelial cells (VDEC) (35, 36), we demonstrate that androgens are able to stimulate the PI3-K, leading within minutes to the phosphorylation of AKT and its downstream targets Bad and FKHR-L1. Furthermore, such an activation of the PI3-K survival pathway is associated with a clear protection against apoptosis by androgens in differentiated VDEC. The present data allow us to depict a new mechanism for androgen action on male genital epithelia, which is different from that proposed during fetal and early postnatal development where androgens are described as indirect regulators of epithelial cell physiology via mesenchymal paracrine-acting factors such as IGF-I and epidermal growth factor (37, 38). Here, we show that androgens act directly on differentiated epithelial cells and trigger survival signaling by mobiliz-

ing the PI3-K, the primary effector of the IGF-I transduction cascade. Interestingly, Li *et al.* (39) have also demonstrated a link between androgen and growth factor signaling pathways in DU145 cells in which AR can directly activate the FKHR transcription factor, but in an AKT-independent manner. Nonetheless, such a mechanism is likely to be specific to this tumoral cell line as we observed a rapid increase in the PI3-K-dependent phosphorylation of AKT in response to androgens in non-transformed differentiated epithelial cells. One important issue of this work is to further determine the molecular targets and subsequent mechanisms involved in the androgen-dependent repression of cell death processes in VDEC.

Studies of non-genomic mechanisms have shown that steroids could alternatively act through classical steroid receptors or through atypical membrane receptors (40). Our results clearly show that the classical androgen receptor (AR) is required for PI3-K pathway activation. Indeed, in the presence of the anti-androgen bicalutamide, which antagonizes AR, R1881 cannot stimulate AKT Ser<sup>473</sup> phosphorylation. Accordingly, in PC3 cells that lack endogenous AR expression, AKT phosphorylation is insensitive to androgens but is enhanced when AR is transiently overexpressed in these cells. This non-genomic stimulation is supported by an interaction of AR with the PI3-K regulatory subunit p85 $\alpha$  as demonstrated by immunoprecipitation in VDEC. Our *In vitro* analyses clearly indicate that two main domains of p85 $\alpha$  are involved in the interaction with AR, the SH3 motif and the C-terminal SH2 domain. These domains are known to bind proline-rich regions and phospho-Tyr respectively, and AR has multiple tyrosine residues and a proline stretch in its N-terminal sequence (41). These data strengthened the central role of this AR region in the non-genomic transduction signal. Indeed, the AR proline stretch is known to interact with the SH3 motif of the Src kinase and allows the formation of an active AR-Src kinase complex in a ligand-dependent manner in some breast and prostate cell lines (16). Interestingly, we did not observe a ligand-dependent interaction between AR and p85 $\alpha$  in pull-down experiments. Such a lack of hormone sensitivity can be explained by the cell-free system context, in which interacting domains are unmasked and available for binding. This hormone-independent interaction between AR and p85 $\alpha$  can be linked with AR overexpression in PC3 cells that leads to an increase in AKT phosphorylation in the absence of ligand. We hypothesize that AR overexpression results in the titration of HSP chaperone known to block AR activity in absence of hormone. Such a mechanism could result in constitutive AR/p85 $\alpha$  interaction leading to an increase in AKT phosphorylation level in PC3 cells. Another hypothesis is that AR overexpression increases its availability at the plasma membrane, leading to furthered PI3-K stimulation.

Taken together, these results clearly points out that the androgenic activation of PI3-K represents an alternative pathway by which androgens could protect the epithelial cells against apoptosis. Further investigations are necessary to determine the extent of the non-genomic androgen actions during genital tract development and/or early prostate carcinogenesis stages.

**Acknowledgments**—We thank Dr. C. White for advice and critical review of the manuscript and D. Cheyvalle and J.P. Saru for technical assistance.

#### REFERENCES

1. Evans, R. M. (1988) *Science* **240**, 889–895
2. Giguere, V., Yang, N., Segui, P., and Evans, R. M. (1988) *Nature* **331**, 91–94
3. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., *et al.* (1995) *Cell* **83**, 835–839
4. Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., and Wehling, M. (2000) *Pharmacol. Rev.* **52**, 513–556
5. Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn,



- M. E., and Shaul, P. W. (1999) *J. Clin. Invest.* **103**, 401–406
6. Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W., and Liao, J. K. (2000) *Nature* **407**, 538–541
7. Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Mineo, C., Liu, P., German, Z., Sherman, T. S., Mendelsohn, M. E., Anderson, R. G., and Shaul, P. W. (2000) *Circ. Res.* **87**, E44–52
8. Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., Taniguchi, N., and Murata, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3459–3467
9. Moss, R. L., and Gu, Q. (1999) *Steroids* **64**, 14–21
10. Sun, M., Paciga, J. E., Feldman, R. I., Yuan, Z., Coppola, D., Lu, Y. Y., Shelley, S. A., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. (2001) *Cancer Res.* **61**, 5985–5991
11. Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., and Auricchio, F. (1998) *EMBO J.* **17**, 2008–2018
12. Bayaa, M., Booth, R. A., Sheng, Y., and Liu, X. J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12607–12612
13. Bagowski, C. P., Myers, J. W., and Ferrell, J. E., Jr. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 37708–37714
14. Boonyaratankornkit, V., Scott, M. P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S. M., Maller, J. L., Miller, W. T., and Edwards, D. P. (2001) *Mol. Cell* **8**, 269–280
15. Peterziel, H., Mink, S., Schonert, A., Becker, M., Klocker, H., and Cato, A. C. (1999) *Oncogene* **18**, 6322–6329
16. Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M. S., Abbondanza, C., and Auricchio, F. (2000) *EMBO J.* **19**, 5406–5417
17. Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G. B., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Roberson, P. K., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., and Manolagas, S. C. (2001) *Cell* **104**, 719–730
18. MacDougall, L. K., Domin, J., and Waterfield, M. D. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 1404–1415
19. Surdo, P. L., Bottomley, M. J., Arcaro, A., Siegal, G., Panayotou, G., Sankar, A., Gaffney, P. R., Riley, A. M., Potter, B. V., Waterfield, M. D., and Driscoll, P. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15678–15685
20. Fruman, D. A., Meyers, R. E., and Cantley, L. C. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 481–507
21. Ruderman, N. B., Kapeller, R., White, M. F., and Cantley, L. C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1411–1415
22. Escobedo, J. A., Navankasattusas, S., Kavanaugh, W. M., Milfay, D., Fried, V. A., and Williams, L. T. (1991) *Cell* **65**, 75–82
23. Cantley, L. C. (2002) *Science* **296**, 1655–1657
24. Ueki, K., Yballe, C. M., Brachmann, S. M., Vicent, D., Watt, J. M., Kahn, C. R., and Cantley, L. C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 419–424
25. Franke, T. F., Kaplan, D. R., and Cantley, L. C. (1997) *Cell* **88**, 435–437
26. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., and Cohen, P. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 261–269
27. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999) *Cell* **96**, 857–868
28. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996) *Cell* **87**, 619–628
29. Gajewski, T. F., and Thompson, C. B. (1996) *Cell* **87**, 589–592
30. Manin, M., Baron, S., Goossens, K., Beaudoin, C., Jean, C., Veyssiere, G., Verhoeven, G., and Morel, L. (2002) *Biochem. J.* **366**, 729–736
31. Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000) *Biochem. J.* **351**, 95–105
32. Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M. J., Gout, I., Totty, N. F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., et al. (1994) *EMBO J.* **13**, 522–533
33. Wennstrom, S., Hawkins, P., Cooke, F., Hara, K., Yonezawa, K., Kasuga, M., Jackson, T., Claesson-Welsh, L., and Stephens, L. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 385–393
34. Yao, R., and Cooper, G. M. (1996) *Oncogene* **13**, 343–351
35. Manin, M., Lecher, P., Martinez, A., Tournadre, S., and Jean, C. (1995) *Biol. Reprod.* **52**, 50–62
36. Manin, M., Martinez, A., Van Der Schueren, B., Reynaert, I., and Jean, C. (2000) *J. Androl.* **21**, 641–650
37. Cunha, G. R. (1996) *Prostate Suppl.* **6**, 22–25
38. Kurita, T., Wang, Y. Z., Donjacour, A. A., Zhao, C., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., Isaacs, J. T., Dahiya, R., and Cunha, G. R. (2001) *Cell Death Differ.* **8**, 192–200
39. Li, P., Lee, H., Guo, S., Unterman, T. G., Jenster, G., and Bai, W. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 104–118
40. Brann, D. W., Hendry, L. B., and Mahesh, V. B. (1995) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**, 113–133
41. Brinkmann, A. O., Faber, P. W., van Rooij, H. C., Kuiper, G. G., Ris, C., Klaassen, P., van der Korput, J. A., Voorhorst, M. M., van Laar, J. H., Mulder, E., et al. (1989) *J. Steroid Biochem.* **34**, 307–310





\*\*\*\*\*

## *Références bibliographiques*

\*\*\*\*\*



- Abate-Shen, C. and Shen, M.M. (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev*, **14**, 2410-2434.
- Abu, E.O., Horner, A., Kusec, V., Triffitt, J.T. and Compston, J.E. (1997) The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 3493-3497.
- AgoulNIK, I.U., Vaid, A., Bingman, W.E., 3rd, Erdeme, H., Frolov, A., Smith, C.L., Ayala, G., Ittmann, M.M. and Weigel, N.L. (2005) Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res*, **65**, 7959-7967.
- Ahmed, K., Yenice, S., Davis, A. and Goueli, S.A. (1993) Association of casein kinase 2 with nuclear chromatin in relation to androgenic regulation of rat prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4426-4430.
- Algarte-Genin, M., Cussenot, O. and Costa, P. (2004) Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur Urol*, **46**, 285-294; discussion 294-285.
- Amantana, A., London, C.A., Iversen, P.L. and Devi, G.R. (2004) X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, **3**, 699-707.
- Andersson, S., Berman, D.M., Jenkins, E.P. and Russell, D.W. (1991) Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, **354**, 159-161.
- Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G. and Pfahl, M. (1994) A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol*, **14**, 7025-7035.
- Aranda, A. and Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, **81**, 1269-1304.
- Arber, D.A., Chang, K.L., Lyda, M.H., Bedell, V., Spielberger, R. and Slovak, M.L. (2003) Detection of NPM/MLF1 fusion in t(3;5)-positive acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Hum Pathol*, **34**, 809-813.
- Ariyaratne, H.B., Mills, N., Mason, J.I. and Mendis-Handagama, S.M. (2000) Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biol Reprod*, **63**, 1115-1123.
- Auger, A.P., Tetel, M.J. and McCarthy, M.M. (2000) Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7551-7555.
- Avila, D.M., Allman, D.R., Gallo, J.M. and McPhaul, M.J. (2003) Androgen receptors containing expanded polyglutamine tracts exhibit progressive toxicity when stably expressed in the neuroblastoma cell line, SH-SY 5Y. *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 982-990.
- Avila, D.M., Zoppi, S. and McPhaul, M.J. (2001) The androgen receptor (AR) in syndromes of androgen insensitivity and in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **76**, 135-142.
- Bailey, C.K., Andriola, I.F., Kampinga, H.H. and Merry, D.E. (2002) Molecular chaperones enhance the degradation of expanded polyglutamine repeat androgen receptor in a cellular model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **11**, 515-523.
- Bakin, R.E., Gioeli, D., Sikes, R.A., Bissonette, E.A. and Weber, M.J. (2003) Constitutive activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, **63**, 1981-1989.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, **384**, 641-643.



- Baran, D.T., Bergfeld, M.A., Teitelbaum, S.L. and Avioli, L.V. (1978) Effect of testosterone therapy on bone formation in an osteoporotic hypogonadal male. *Calcif Tissue Res*, **26**, 103-106.
- Baron, S., Manin, M., Beaudoin, C., Leotoing, L., Communal, Y., Veyssiere, G. and Morel, L. (2004) Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem*, **279**, 14579-14586.
- Bartlett, J.M., Brawley, D., Grigor, K., Munro, A.F., Dunne, B. and Edwards, J. (2005) Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer. *J Pathol*, **205**, 522-529.
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. and Valentinis, B. (1997) The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1332**, F105-126.
- Basu, A. (1993) The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol Ther*, **59**, 257-280.
- Baumgartner, R.N., Waters, D.L., Gallagher, D., Morley, J.E. and Garry, P.J. (1999) Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mech Ageing Dev*, **107**, 123-136.
- Bavner, A., Sanyal, S., Gustafsson, J.A. and Treuter, E. (2005) Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol Metab*, **16**, 478-488.
- Beilin, J., Ball, E.M., Favaloro, J.M. and Zajac, J.D. (2000) Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol*, **25**, 85-96.
- Belanger, C., Luu-The, V., Dupont, P. and Tchernof, A. (2002) Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res*, **34**, 737-745.
- Benito, M., Gomberg, B., Wehrli, F.W., Weening, R.H., Zemel, B., Wright, A.C., Song, H.K., Cucchiara, A. and Snyder, P.J. (2003) Deterioration of trabecular architecture in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 1497-1502.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., Mossmann, H. and Wunderlich, F. (1999a) Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *Faseb J*, **13**, 123-133.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z. and Wunderlich, F. (1999b) Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell*, **10**, 3113-3123.
- Berrevoets, C.A., Umar, A., Trapman, J. and Brinkmann, A.O. (2004) Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR). *Biochem J*, **379**, 731-738.
- Bhasin, S., Taylor, W.E., Singh, R., Artaza, J., Sinha-Hikim, I., Jasuja, R., Choi, H. and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2003) The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **58**, M1103-1110.
- Blackledge, G.R., Cockshott, I.D. and Furr, B.J. (1997) Casodex (bicalutamide): overview of a new antiandrogen developed for the treatment of prostate cancer. *Eur Urol*, **31 Suppl 2**, 30-39.
- Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y. and Ozato, K. (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev*, **12**, 1638-1651.
- Blok, L.J., de Ruiter, P.E. and Brinkmann, A.O. (1998) Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry*, **37**, 3850-3857.



- Bocker, T., Bittinger, A., Wieland, W., Buettner, R., Fauser, G., Hofstaedter, F. and Ruschoff, J. (1995) In vitro and ex vivo expression of nucleolar proteins B23 and p120 in benign and malignant epithelial lesions of the prostate. *Mod Pathol*, **8**, 226-231.
- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M. and Nigg, E.A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, **56**, 379-390.
- Bornstein, S.R., Rutkowski, H. and Vrezas, I. (2004) Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **215**, 135-141.
- Bostwick, D.G. and Qian, J. (2004) High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol*, **17**, 360-379.
- Bourguet, W., Germain, P. and Gronemeyer, H. (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 381-388.
- Bravo, M.P., Castellanos, E. and del Rey Calero, J. (1991) Dietary factors and prostatic cancer. *Urol Int*, **46**, 163-166.
- Brinkmann, A.O. (2001) Lessons to be learned from the androgen receptor. *Eur J Dermatol*, **11**, 301-303.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002a) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, **2**, 243-247.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002b) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Bubendorf, L., Kolmer, M., Kononen, J., Koivisto, P., Mousses, S., Chen, Y., Mahlamaki, E., Schraml, P., Moch, H., Willi, N., Elkhouloun, A.G., Pretlow, T.G., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J., Sauter, G. and Kallioniemi, O.P. (1999) Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1758-1764.
- Burchardt, M., Burchardt, T., Chen, M.W., Hayek, O.R., Knight, C., Shabsigh, A., de La Taille, A. and Buttyan, R. (2000) Vascular endothelial growth factor-A expression in the rat ventral prostate gland and the early effects of castration. *Prostate*, **43**, 184-194.
- Burchardt, M., Burchardt, T., Shabsigh, A., Ghafar, M., Chen, M.W., Anastasiadis, A., de la Taille, A., Kiss, A. and Buttyan, R. (2001) Reduction of wild type p53 function confers a hormone resistant phenotype on LNCaP prostate cancer cells. *Prostate*, **48**, 225-230.
- Buttyan, R., Ghafar, M.A. and Shabsigh, A. (2000) The effects of androgen deprivation on the prostate gland: cell death mediated by vascular regression. *Curr Opin Urol*, **10**, 415-420.
- Buttyan, R., Shabsigh, A., Perlman, H. and Colombel, M. (1999) Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids. *Trends Endocrinol Metab*, **10**, 47-54.
- Cardozo, C.P., Michaud, C., Ost, M.C., Fliss, A.E., Yang, E., Patterson, C., Hall, S.J. and Caplan, A.J. (2003) C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation. *Arch Biochem Biophys*, **410**, 134-140.
- Carruba, G., Miceli, M.D., Comito, L., Farruggio, R., Sorci, C.M., Oliveri, G., Amodio, R., di Falco, M., d'Amico, D. and Castagnetta, L.A. (1996) Multiple estrogen function in human prostate cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, **784**, 70-84.
- Cazzaniga, G., Dell'Oro, M.G., Mecucci, C., Giarin, E., Masetti, R., Rossi, V., Locatelli, F., Martelli, M.F., Basso, G., Pession, A., Biondi, A. and Falini, B. (2005) Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood*, **106**, 1419-1422.
- Ceraline, J., Cruchant, M.D., Erdmann, E., Erbs, P., Kurtz, J.E., Duclos, B., Jacqmin, D., Chopin, D. and Bergerat, J.P. (2004) Constitutive activation of the androgen receptor





- by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer*, **108**, 152-157.
- Cervoni, N., Detich, N., Seo, S.B., Chakravarti, D. and Szyf, M. (2002) The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J Biol Chem*, **277**, 25026-25031.
- Chakraborty, M., Qiu, S.G., Vasudevan, K.M. and Rangnekar, V.M. (2001) Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res*, **61**, 7255-7263.
- Chamberlain, N.L., Driver, E.D. and Miesfeld, R.L. (1994) The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3181-3186.
- Chan, H.M. and La Thangue, N.B. (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*, **114**, 2363-2373.
- Chan, J.M., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., Gann, P.H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C.H. and Pollak, M. (1998) Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*, **279**, 563-566.
- Chang, C.S., Kokontis, J. and Liao, S.T. (1988) Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7211-7215.
- Chang, J.H. and Olson, M.O. (1989) A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 mRNA. *J Biol Chem*, **264**, 11732-11737.
- Chen, C.D., Welsbie, D.S., Tran, C., Baek, S.H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M.G. and Sawyers, C.L. (2004) Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*, **10**, 33-39.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999a) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454-457.
- Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., van Breemen, R., Ashton, D. and Bowen, P.E. (2001) Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1872-1879.
- Chen, T., Cho, R.W., Stork, P.J. and Weber, M.J. (1999b) Elevation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate potentiates activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, **59**, 213-218.
- Chen, T., Wang, L.H. and Farrar, W.L. (2000) Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, **60**, 2132-2135.
- Chen, Y., Mills, J.D. and Periasamy, A. (2003) Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation*, **71**, 528-541.
- Cheng, S., Brzostek, S., Lee, S.R., Hollenberg, A.N. and Balk, S.P. (2002) Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol*, **16**, 1492-1501.



- Chevalier-Larsen, E.S., O'Brien, C.J., Wang, H., Jenkins, S.C., Holder, L., Lieberman, A.P. and Merry, D.E. (2004) Castration restores function and neurofilament alterations of aged symptomatic males in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci*, **24**, 4778-4786.
- Chevillard-Briet, M., Trouche, D. and Vandel, L. (2002) Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *Embo J*, **21**, 5457-5466.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y. and Reinberg, D. (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol*, **18**, 5355-5363.
- Chou, C.C. and Yung, B.Y. (2001) Increased stability of nucleophosmin/B23 in anti-apoptotic effect of ras during serum deprivation. *Mol Pharmacol*, **59**, 38-45.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. and Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**, 855-859.
- Chung, L.W. (1995) The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv*, **23**, 33-42.
- Chung, T.D., Yu, J.J., Kong, T.A., Spiotto, M.T. and Lin, J.M. (2000) Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate*, **42**, 1-7.
- Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G. and Rombauts, W. (2001) Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **76**, 23-30.
- Clark, B.J. and Stocco, D.M. (1995) Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocr Res*, **21**, 243-257.
- Clark, L.C., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Leshner, J.L., Jr., Park, H.K., Sanders, B.B., Jr., Smith, C.L. and Taylor, J.R. (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Jama*, **276**, 1957-1963.
- Clark, L.C., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Witherington, R., Herlong, J.H., Janosko, E., Carpenter, D., Borosso, C., Falk, S. and Rounder, J. (1998) Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol*, **81**, 730-734.
- Cleutjens, K.B., van der Korput, H.A., Ehren-van Eekelen, C.C., Sikes, R.A., Fasciana, C., Chung, L.W. and Trapman, J. (1997) A 6-kb promoter fragment mimics in transgenic mice the prostate-specific and androgen-regulated expression of the endogenous prostate-specific antigen gene in humans. *Mol Endocrinol*, **11**, 1256-1265.
- Cohen, P., Peehl, D.M., Lamson, G. and Rosenfeld, R.G. (1991) Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **73**, 401-407.
- Colombo, E., Bonetti, P., Lazzerini Denchi, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J.C., Helin, K., Falini, B. and Pelicci, P.G. (2005) Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol*, **25**, 8874-8886.
- Colombo, E., Marine, J.C., Danovi, D., Falini, B. and Pelicci, P.G. (2002) Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*, **4**, 529-533.
- Colvard, D.S., Eriksen, E.F., Keeting, P.E., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., French, F.S., Riggs, B.L. and Spelsberg, T.C. (1989) Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 854-857.



- Conde, I., Alfaro, J.M., Fraile, B., Ruiz, A., Paniagua, R. and Arenas, M.I. (2004) DAX-1 expression in human breast cancer: comparison with estrogen receptors ER-alpha, ER-beta and androgen receptor status. *Breast Cancer Res*, **6**, R140-148.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*, **3**, 93-96.
- Cox, R.L. and Crawford, E.D. (1995) Estrogens in the treatment of prostate cancer. *J Urol*, **154**, 1991-1998.
- Craft, N., Chhor, C., Tran, C., Belldgrun, A., DeKernion, J., Witte, O.N., Said, J., Reiter, R.E. and Sawyers, C.L. (1999a) Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. *Cancer Res*, **59**, 5030-5036.
- Craft, N., Shostak, Y., Carey, M. and Sawyers, C.L. (1999b) A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med*, **5**, 280-285.
- Cronauer, M.V., Schulz, W.A., Burchardt, T., Ackermann, R. and Burchardt, M. (2004) Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. *Oncogene*, **23**, 3541-3549.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Hittmair, A., Zhang, J., Thurnher, M., Bartsch, G. and Klocker, H. (1996) Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate*, **28**, 392-405.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G. and Klocker, H. (1994) Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res*, **54**, 5474-5478.
- Cunha, G.R. (1996) Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate Suppl*, **6**, 22-25.
- Cunha, G.R. and Chung, L.W. (1981) Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem*, **14**, 1317-1324.
- Cunha, G.R., Ricke, W., Thomson, A., Marker, P.C., Risbridger, G., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., Donjacour, A.A. and Kurita, T. (2004) Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **92**, 221-236.
- Cunha, G.R. and Young, P. (1991) Inability of Tfm (testicular feminization) epithelial cells to express androgen-dependent seminal vesicle secretory proteins in chimeric tissue recombinants. *Endocrinology*, **128**, 3293-3298.
- Cussenot, O. and Valeri, A. (2001) Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur J Intern Med*, **12**, 11-16.
- Darne, C., Veyssiere, G. and Jean, C. (1998) Phorbol ester causes ligand-independent activation of the androgen receptor. *Eur J Biochem*, **256**, 541-549.
- Davies, M.A., Koul, D., Dhesi, H., Berman, R., McDonnell, T.J., McConkey, D., Yung, W.K. and Steck, P.A. (1999) Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res*, **59**, 2551-2556.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. and van Kuilenburg, A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, **370**, 737-749.
- Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (2004) Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, **23**, 2950-2966.



- Debes, J.D., Schmidt, L.J., Huang, H. and Tindall, D.J. (2002) p300 mediates androgen-independent transactivation of the androgen receptor by interleukin 6. *Cancer Res*, **62**, 5632-5636.
- den Besten, W., Kuo, M.L., Williams, R.T. and Sherr, C.J. (2005) Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle*, **4**, 1593-1598.
- Dhar, S.K., Lynn, B.C., Daosukho, C. and St Clair, D.K. (2004) Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J Biol Chem*, **279**, 28209-28219.
- Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C. and Pandolfi, P.P. (2001) Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet*, **27**, 222-224.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. and Pandolfi, P.P. (1998) Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet*, **19**, 348-355.
- Di Lorenzo, G., Tortora, G., D'Armiento, F.P., De Rosa, G., Staibano, S., Autorino, R., D'Armiento, M., De Laurentiis, M., De Placido, S., Catalano, G., Bianco, A.R. and Ciardiello, F. (2002) Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **8**, 3438-3444.
- di Sant'Agnese, P.A. (1992) Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer*, **70**, 254-268.
- DiGiovanni, J., Kiguchi, K., Frijhoff, A., Wilker, E., Bol, D.K., Beltran, L., Moats, S., Ramirez, A., Jorcano, J. and Conti, C. (2000) Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3455-3460.
- Djakiew, D. (2000) Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate*, **42**, 150-160.
- Dole, E.J. and Holdsworth, M.T. (1997) Nilutamide: an antiandrogen for the treatment of prostate cancer. *Ann Pharmacother*, **31**, 65-75.
- Donjacour, A.A. and Cunha, G.R. (1993) Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology*, **132**, 2342-2350.
- Dotzlaw, H., Moehren, U., Mink, S., Cato, A.C., Iniguez Lluhi, J.A. and Baniahmad, A. (2002) The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol*, **16**, 661-673.
- Drachenberg, D.E., Elgamal, A.A., Rowbotham, R., Peterson, M. and Murphy, G.P. (1999) Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate*, **41**, 127-133.
- Dufau, M.L. (1998) The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol*, **60**, 461-496.
- Dumbar, T.S., Gentry, G.A. and Olson, M.O. (1989) Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry*, **28**, 9495-9501.
- Eason, J.M., Dodd, S.L. and Powers, S.K. (2003) Use of anabolic steroids to attenuate the effects of glucocorticoids on the rat diaphragm. *Phys Ther*, **83**, 29-36.
- Eckner, R., Arany, Z., Ewen, M., Sellers, W. and Livingston, D.M. (1994a) The adenovirus E1A-associated 300-kD protein exhibits properties of a transcriptional coactivator and belongs to an evolutionarily conserved family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **59**, 85-95.
- Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B. and Livingston, D.M. (1994b) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus





- E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*, **8**, 869-884.
- Edwards, J., Krishna, N.S., Grigor, K.M. and Bartlett, J.M. (2003) Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer*, **89**, 552-556.
- Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Propp, S.S., Ellerby, H.M., Rabizadeh, S., Cashman, N.R., Trifiro, M.A., Pinsky, L., Wellington, C.L., Salvesen, G.S., Hayden, M.R. and Bredesen, D.E. (1999) Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem*, **72**, 185-195.
- English, H.F., Kyprianou, N. and Isaacs, J.T. (1989) Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate*, **15**, 233-250.
- English, H.F., Santen, R.J. and Isaacs, J.T. (1987) Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate*, **11**, 229-242.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, 342-348.
- Faderl, S., Gidel, C., Kantarjian, H.M., Manshouri, T., Keating, M. and Albitar, M. (2001) Loss of heterozygosity on chromosome 5 in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, **25**, 39-43.
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettrossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G. and Martelli, M.F. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, **352**, 254-266.
- Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, **52**, 513-556.
- Fang, Y., Fliss, A.E., Robins, D.M. and Caplan, A.J. (1996) Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J Biol Chem*, **271**, 28697-28702.
- Ferrando, A.A., Sheffield-Moore, M., Paddon-Jones, D., Wolfe, R.R. and Urban, R.J. (2003) Differential anabolic effects of testosterone and amino acid feeding in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 358-362.
- Fix, C., Jordan, C., Cano, P. and Walker, W.H. (2004) Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10919-10924.
- Fong, C.J., Sherwood, E.R., Mendelsohn, J., Lee, C. and Kozlowski, J.M. (1992) Epidermal growth factor receptor monoclonal antibody inhibits constitutive receptor phosphorylation, reduces autonomous growth, and sensitizes androgen-independent prostatic carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res*, **52**, 5887-5892.
- Fowler, J.E., Jr., Lau, J.L., Ghosh, L., Mills, S.E. and Mounzer, A. (1988) Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: an immunohistochemical study. *J Urol*, **139**, 857-861.
- Francis, R.M., Peacock, M., Aaron, J.E., Selby, P.L., Taylor, G.A., Thompson, J., Marshall, D.H. and Horsman, A. (1986) Osteoporosis in hypogonadal men: role of decreased plasma 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium malabsorption, and low bone formation. *Bone*, **7**, 261-268.
- Franck-Lissbrant, I., Haggstrom, S., Damber, J.E. and Bergh, A. (1998) Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology*, **139**, 451-456.



- Freeman, B.C. and Yamamoto, K.R. (2002) Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science*, **296**, 2232-2235.
- Freeman, D.A. and Ascoli, M. (1982) Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J Biol Chem*, **257**, 14231-14238.
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., Liu, X. and Wu, H. (2003) PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, **3**, 117-130.
- Fronsdal, K., Engedal, N., Slagsvold, T. and Saatcioglu, F. (1998) CREB binding protein is a coactivator for the androgen receptor and mediates cross-talk with AP-1. *J Biol Chem*, **273**, 31853-31859.
- Fryburg, D.A., Jahn, L.A., Hill, S.A., Oliveras, D.M. and Barrett, E.J. (1995) Insulin and insulin-like growth factor-I enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms. *J Clin Invest*, **96**, 1722-1729.
- Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Di Vizio, D., Zhang, X., Albanese, C., Balk, S., Chang, C., Fan, S., Rosen, E., Palvimo, J.J., Janne, O.A., Muratoglu, S., Avantaggiati, M.L. and Pestell, R.G. (2003) Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol*, **23**, 8563-8575.
- Fu, M., Wang, C., Reutens, A.T., Wang, J., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Ogryzko, V., Avantaggiati, M.L. and Pestell, R.G. (2000) p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem*, **275**, 20853-20860.
- Fu, M., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., Sakamaki, T., Yeung, Y.G., Chang, C., Hopp, T., Fuqua, S.A., Jaffray, E., Hay, R.T., Palvimo, J.J., Janne, O.A. and Pestell, R.G. (2002) Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function. *Mol Cell Biol*, **22**, 3373-3388.
- Fujii, T., Saito, M., Iwasaki, E., Ochiya, T., Takei, Y., Hayashi, S., Ono, A., Hirao, N., Nakamura, M., Kubushiro, K., Tsukazaki, K. and Aoki, D. (2006) Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol*, **29**, 541-548.
- Gao, T. and McPhaul, M.J. (1998) Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Mol Endocrinol*, **12**, 654-663.
- Gaughan, L., Logan, I.R., Cook, S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2002) Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem*, **277**, 25904-25913.
- Gehin, M., Mark, M., Dennefeld, C., Dierich, A., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (2002) The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol*, **22**, 5923-5937.
- Gelfanov, V.M., Burgess, G.S., Litz-Jackson, S., King, A.J., Marshall, M.S., Nakshatri, H. and Boswell, H.S. (2001) Transformation of interleukin-3-dependent cells without participation of Stat5/bcl-xL: cooperation of akt with raf/erk leads to p65 nuclear factor kappaB-mediated antiapoptosis involving c-IAP2. *Blood*, **98**, 2508-2517.
- Georget, V., Lobaccaro, J.M., Terouanne, B., Mangeat, P., Nicolas, J.C. and Sultan, C. (1997) Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, **129**, 17-26.



- Georget, V., Terouanne, B., Nicolas, J.C. and Sultan, C. (2002) Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry*, **41**, 11824-11831.
- Ghosh, P.M., Malik, S., Bedolla, R. and Kreisberg, J.I. (2003) Akt in prostate cancer: possible role in androgen-independence. *Curr Drug Metab*, **4**, 487-496.
- Gioeli, D., Ficarro, S.B., Kwiek, J.J., Aaronson, D., Hancock, M., Catling, A.D., White, F.M., Christian, R.E., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Weber, M.J. (2002) Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, **277**, 29304-29314.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Chute, C.C. and Willett, W.C. (1993) A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 1571-1579.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Liu, Y., Stampfer, M.J. and Willett, W.C. (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 391-398.
- Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, A., Talcott, J., Hennekens, C.H. and Kantoff, P.W. (1997) The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3320-3323.
- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, **14**, 121-141.
- Gobinet, J., Auzou, G., Nicolas, J.C., Sultan, C. and Jalaguier, S. (2001) Characterization of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP. *Biochemistry*, **40**, 15369-15377.
- Goktas, S. and Crawford, E.D. (1999) Optimal hormonal therapy for advanced prostatic carcinoma. *Semin Oncol*, **26**, 162-173.
- Goldstein, L.A. and Sengelaub, D.R. (1992) Timing and duration of dihydrotestosterone treatment affect the development of motoneuron number and morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J Comp Neurol*, **326**, 147-157.
- Gong, J., Zhu, J., Goodman, O.B., Jr., Pestell, R.G., Schlegel, P.N., Nanus, D.M. and Shen, R. (2006) Activation of p300 histone acetyltransferase activity and acetylation of the androgen receptor by bombesin in prostate cancer cells. *Oncogene*, **25**, 2011-2021.
- Goodin, S., Rao, K.V. and DiPaola, R.S. (2002) State-of-the-art treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Oncologist*, **7**, 360-370.
- Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, **14**, 1553-1577.
- Greenland, K.J. and Zajac, J.D. (2004) Kennedy's disease: pathogenesis and clinical approaches. *Intern Med J*, **34**, 279-286.
- Gregory, C.W., Fei, X., Ponguta, L.A., He, B., Bill, H.M., French, F.S. and Wilson, E.M. (2004) Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J Biol Chem*, **279**, 7119-7130.
- Gregory, C.W., He, B., Johnson, R.T., Ford, O.H., Mohler, J.L., French, F.S. and Wilson, E.M. (2001) A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*, **61**, 4315-4319.
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K. and Pandolfi, P.P. (2005) Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*, **437**, 147-153.
- Gronberg, H. (2003) Prostate cancer epidemiology. *Lancet*, **361**, 859-864.



- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A. and Shiekhataar, R. (2000) A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev*, **14**, 1048-1057.
- Guo, C., Yu, S., Davis, A.T. and Ahmed, K. (1999) Nuclear matrix targeting of the protein kinase CK2 signal as a common downstream response to androgen or growth factor stimulation of prostate cancer cells. *Cancer Res*, **59**, 1146-1151.
- Haggstrom, S., Wikstrom, P., Bergh, A. and Damber, J.E. (1998) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rat ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration. *Prostate*, **36**, 71-79.
- Hales, D.B., Sha, L. and Payne, A.H. (1990) Glucocorticoid and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-mediated induction of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450scc) in MA-10 tumor Leydig cells. Increases in mRNA are cycloheximide sensitive. *Endocrinology*, **126**, 2800-2808.
- Halkidou, K., Gnanapragasam, V.J., Mehta, P.B., Logan, I.R., Brady, M.E., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2003) Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene*, **22**, 2466-2477.
- Harman, S.M., Metter, E.J., Blackman, M.R., Landis, P.K. and Carter, H.B. (2000) Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3, and prostate-specific antigen as predictors of clinical prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4258-4265.
- Harris, K.A. and Reese, D.M. (2001) Treatment options in hormone-refractory prostate cancer: current and future approaches. *Drugs*, **61**, 2177-2192.
- Hayes, R.B., Ziegler, R.G., Gridley, G., Swanson, C., Greenberg, R.S., Swanson, G.M., Schoenberg, J.B., Silverman, D.T., Brown, L.M., Pottern, L.M., Liff, J., Schwartz, A.G., Fraumeni, J.F., Jr. and Hoover, R.N. (1999) Dietary factors and risks for prostate cancer among blacks and whites in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 25-34.
- Hayes, S.A. and Dice, J.F. (1996) Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol*, **132**, 255-258.
- Hayes, S.A., Zarnegar, M., Sharma, M., Yang, F., Peehl, D.M., ten Dijke, P. and Sun, Z. (2001) SMAD3 represses androgen receptor-mediated transcription. *Cancer Res*, **61**, 2112-2118.
- He, B., Bai, S., Hnat, A.T., Kalman, R.I., Minges, J.T., Patterson, C. and Wilson, E.M. (2004) An androgen receptor NH2-terminal conserved motif interacts with the COOH terminus of the Hsp70-interacting protein (CHIP). *J Biol Chem*, **279**, 30643-30653.
- He, B., Bowen, N.T., Minges, J.T. and Wilson, E.M. (2001) Androgen-induced NH2- and COOH-terminal interaction inhibits p160 coactivator recruitment by activation function 2. *J Biol Chem*, **276**, 42293-42301.
- He, B. and Wilson, E.M. (2002) The NH(2)-terminal and carboxyl-terminal interaction in the human androgen receptor. *Mol Genet Metab*, **75**, 293-298.
- Heery, D.M., Hoare, S., Hussain, S., Parker, M.G. and Sheppard, H. (2001) Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem*, **276**, 6695-6702.
- Heinlein, C.A. and Chang, C. (2001) Role of chaperones in nuclear translocation and transactivation of steroid receptors. *Endocrine*, **14**, 143-149.
- Heinlein, C.A. and Chang, C. (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*, **16**, 2181-2187.
- Heinonen, O.P., Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P.R., Huttunen, J.K., Hartman, A.M., Haapakoski, J., Malila, N., Rautalahti, M., Ripatti, S., Maenpaa, H., Teerenhovi, L., Koss, L., Virolainen, M. and Edwards, B.K. (1998) Prostate cancer and





- supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 440-446.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, **387**, 43-48.
- Hernandez, I., Maddison, L.A., Wei, Y., DeMayo, F., Petras, T., Li, B., Gingrich, J.R., Rosen, J.M. and Greenberg, N.M. (2003) Prostate-specific expression of p53(R172L) differentially regulates p21, Bax, and mdm2 to inhibit prostate cancer progression and prolong survival. *Mol Cancer Res*, **1**, 1036-1047.
- Herrera, J.E., Savkur, R. and Olson, M.O. (1995) The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3974-3979.
- Hickson, R.C., Czerwinski, S.M., Falduto, M.T. and Young, A.P. (1990) Glucocorticoid antagonism by exercise and androgenic-anabolic steroids. *Med Sci Sports Exerc*, **22**, 331-340.
- Hill, C. and Doyon, F. (2004) [Frequency of cancer in France: 2004 update]. *Bull Cancer*, **91**, 9-14.
- Hill, C. and Doyon, F. (2005) [The frequency of cancer in France in year 2000, and trends since 1950]. *Bull Cancer*, **92**, 7-11.
- Hobisch, A., Rogatsch, H., Hittmair, A., Fuchs, D., Bartsch, G., Jr., Klocker, H., Bartsch, G. and Culig, Z. (2000) Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *J Pathol*, **191**, 239-244.
- Hodgson, M.C., Astapova, I., Cheng, S., Lee, L.J., Verhoeven, M.C., Choi, E., Balk, S.P. and Hollenberg, A.N. (2005) The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *J Biol Chem*, **280**, 6511-6519.
- Hoffman, B., Amanullah, A., Shafarenko, M. and Liebermann, D.A. (2002) The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene*, **21**, 3414-3421.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, **318**, 635-641.
- Holter, E., Kotaja, N., Makela, S., Strauss, L., Kietz, S., Janne, O.A., Gustafsson, J.A., Palvimo, J.J. and Treuter, E. (2002) Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. *Mol Endocrinol*, **16**, 515-528.
- Hong, H., Kao, C., Jeng, M.H., Eble, J.N., Koch, M.O., Gardner, T.A., Zhang, S., Li, L., Pan, C.X., Hu, Z., MacLennan, G.T. and Cheng, L. (2004) Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. *Cancer*, **101**, 83-89.
- Hoosein, N., Abdul, M. and McCabe, R. (1995) Clinical significance of elevation in neuroendocrine factors and interleukin-6 in metastatic prostate cancer. *Urol Oncol*, **1**, 246-251.
- Hsiao, P.W., Lin, D.L., Nakao, R. and Chang, C. (1999) The linkage of Kennedy's neuron disease to ARA24, the first identified androgen receptor polyglutamine region-associated coactivator. *J Biol Chem*, **274**, 20229-20234.
- Hsu, C.Y. and Yung, B.Y. (1998) Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncogene*, **16**, 915-923.



- Hsu, C.Y. and Yung, B.Y. (2000) Over-expression of nucleophosmin/B23 decreases the susceptibility of human leukemia HL-60 cells to retinoic acid-induced differentiation and apoptosis. *Int J Cancer*, **88**, 392-400.
- Htun, H., Holth, L.T., Walker, D., Davie, J.R. and Hager, G.L. (1999) Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell*, **10**, 471-486.
- Huang, Z.Q., Li, J., Sachs, L.M., Cole, P.A. and Wong, J. (2003) A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *Embo J*, **22**, 2146-2155.
- Huggins, C. and Hodges, C.V. (1972) Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin*, **22**, 232-240.
- Ichinose, H., Garnier, J.M., Chambon, P. and Losson, R. (1997) Ligand-dependent interaction between the estrogen receptor and the human homologues of SWI2/SNF2. *Gene*, **188**, 95-100.
- Ingles, S.A., Coetzee, G.A., Ross, R.K., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., Crocitto, L., Wang, W. and Haile, R.W. (1998) Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans. *Cancer Res*, **58**, 1620-1623.
- Inouye, C.J. and Seto, E. (1994) Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem*, **269**, 6506-6510.
- Irvine, R.A., Ma, H., Yu, M.C., Ross, R.K., Stallcup, M.R. and Coetzee, G.A. (2000) Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum Mol Genet*, **9**, 267-274.
- Irvine, R.A., Yu, M.C., Ross, R.K. and Coetzee, G.A. (1995) The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res*, **55**, 1937-1940.
- Isaacs, J.T. (1994) Etiology of benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol*, **25 Suppl 1**, 6-9.
- Ishihara, K., Yamagishi, N., Saito, Y., Adachi, H., Kobayashi, Y., Sobue, G., Ohtsuka, K. and Hatayama, T. (2003) Hsp105alpha suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. *J Biol Chem*, **278**, 25143-25150.
- Ismail, H.A., Lessard, L., Mes-Masson, A.M. and Saad, F. (2004) Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate*, **58**, 308-313.
- Ito, M., Yu, R. and Jameson, J.L. (1997) DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol*, **17**, 1476-1483.
- Iyer, A.K. and McCabe, E.R. (2004) Molecular mechanisms of DAX1 action. *Mol Genet Metab*, **83**, 60-73.
- Jackson, T.A., Richer, J.K., Bain, D.L., Takimoto, G.S., Tung, L. and Horwitz, K.B. (1997) The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol*, **11**, 693-705.
- Jenster, G., van der Korput, H.A., Trapman, J. and Brinkmann, A.O. (1995) Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem*, **270**, 7341-7346.
- Jeong, B.C., Hong, C.Y., Chattopadhyay, S., Park, J.H., Gong, E.Y., Kim, H.J., Chun, S.Y. and Lee, K. (2004) Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol Endocrinol*, **18**, 13-25.



- Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem*, **276**, 42938-42944.
- Johansson, L., Thomsen, J.S., Damdimopoulos, A.E., Spyrou, G., Gustafsson, J.A. and Treuter, E. (1999) The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem*, **274**, 345-353.
- Joniau, S., Goeman, L., Pennings, J. and Van Poppel, H. (2005) Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. *Eur Urol*, **48**, 379-385.
- Kajiwara, T., Takeuchi, T., Ueki, T., Moriyama, N., Ueki, K., Kakizoe, T. and Kawabe, K. (1999) Effect of Bcl-2 overexpression in human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Urol*, **6**, 520-525.
- Kamel, H.K., Maas, D. and Duthie, E.H., Jr. (2002) Role of hormones in the pathogenesis and management of sarcopenia. *Drugs Aging*, **19**, 865-877.
- Kamimura, D., Ishihara, K. and Hirano, T. (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **149**, 1-38.
- Kang, H.Y., Cho, C.L., Huang, K.L., Wang, J.C., Hu, Y.C., Lin, H.K., Chang, C. and Huang, K.E. (2004a) Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res*, **19**, 1181-1190.
- Kang, H.Y., Huang, K.E., Chang, S.Y., Ma, W.L., Lin, W.J. and Chang, C. (2002a) Differential modulation of androgen receptor-mediated transactivation by Smad3 and tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem*, **277**, 43749-43756.
- Kang, H.Y., Lin, H.K., Hu, Y.C., Yeh, S., Huang, K.E. and Chang, C. (2001) From transforming growth factor-beta signaling to androgen action: identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3018-3023.
- Kang, H.Y., Yeh, S., Fujimoto, N. and Chang, C. (1999) Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. *J Biol Chem*, **274**, 8570-8576.
- Kang, Z., Janne, O.A. and Palvimo, J.J. (2004b) Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **18**, 2633-2648.
- Kang, Z., Pirskanen, A., Janne, O.A. and Palvimo, J.J. (2002b) Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem*, **277**, 48366-48371.
- Karvonen, U., Janne, O.A. and Palvimo, J.J. (2002) Pure antiandrogens disrupt the recruitment of coactivator GRIP1 to colocalize with androgen receptor in nuclei. *FEBS Lett*, **523**, 43-47.
- Kastan, M.B., Canman, C.E. and Leonard, C.J. (1995) P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **14**, 3-15.
- Katsuno, M., Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M. and Sobue, G. (2002) Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron*, **35**, 843-854.
- Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H. and Kato, S. (2003) Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9416-9421.



- Keeney, D.S. and Mason, J.I. (1992) Expression of testicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5----4-isomerase: regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. *Endocrinology*, **130**, 2007-2015.
- Kelly, R.W., Holland, P., Skibinski, G., Harrison, C., McMillan, L., Hargreave, T. and James, K. (1991) Extracellular organelles (prostasomes) are immunosuppressive components of human semen. *Clin Exp Immunol*, **86**, 550-556.
- Kemper, J.K., Kim, H., Miao, J., Bhalla, S. and Bae, Y. (2004) Role of an mSin3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol Cell Biol*, **24**, 7707-7719.
- Kennedy, W.R., Alter, M. and Sung, J.H. (1968) Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology*, **18**, 671-680.
- Kerley, J.S., Olsen, S.L., Freemantle, S.J. and Spinella, M.J. (2001) Transcriptional activation of the nuclear receptor corepressor RIP140 by retinoic acid: a potential negative-feedback regulatory mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 969-975.
- Kersten, S., Desvergne, B. and Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, **405**, 421-424.
- Kim, D.W. and Lassar, A.B. (2003) Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2. *Mol Cell Biol*, **23**, 8704-8717.
- Kim, J., Jia, L., Tilley, W.D. and Coetzee, G.A. (2003) Dynamic methylation of histone H3 at lysine 4 in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6741-6747.
- Kino, T., De Martino, M.U., Charmandari, E., Mirani, M. and Chrousos, G.P. (2003) Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**, 457-467.
- Knudsen, K.E., Arden, K.C. and Cavenee, W.K. (1998) Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem*, **273**, 20213-20222.
- Knudsen, K.E., Cavenee, W.K. and Arden, K.C. (1999) D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res*, **59**, 2297-2301.
- Kobayashi, Y., Kume, A., Li, M., Doyu, M., Hata, M., Ohtsuka, K. and Sobue, G. (2000) Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem*, **275**, 8772-8778.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H. and Stallcup, M.R. (2001) Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*, **276**, 1089-1098.
- Koh, S.S., Li, H., Lee, Y.H., Widelitz, R.B., Chuong, C.M. and Stallcup, M.R. (2002) Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J Biol Chem*, **277**, 26031-26035.
- Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T. and Kallioniemi, O.P. (1997) Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res*, **57**, 314-319.
- Kollara, A., Diamandis, E.P. and Brown, T.J. (2003) Secretion of endogenous kallikreins 2 and 3 by androgen receptor-transfected PC-3 prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **84**, 493-502.





- Kondo, T., Minamino, N., Nagamura-Inoue, T., Matsumoto, M., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (1997) Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene*, **15**, 1275-1281.
- Kousteni, S., Chen, J.R., Bellido, T., Han, L., Ali, A.A., O'Brien, C.A., Plotkin, L., Fu, Q., Mancino, A.T., Wen, Y., Vertino, A.M., Powers, C.C., Stewart, S.A., Ebert, R., Parfitt, A.M., Weinstein, R.S., Jilka, R.L. and Manolagas, S.C. (2002) Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science*, **298**, 843-846.
- Kousteni, S., Han, L., Chen, J.R., Almeida, M., Plotkin, L.I., Bellido, T. and Manolagas, S.C. (2003) Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest*, **111**, 1651-1664.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Bubendorf, L., Kallioniemi, O.P., Shabaik, A., Vitiello, A., Peehl, D., Gao, G.J. and Reed, J.C. (2003) Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 4914-4925.
- Kraus, W.L., Manning, E.T. and Kadonaga, J.T. (1999) Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates. *Mol Cell Biol*, **19**, 8123-8135.
- Krieger, J.N. and Rein, M.F. (1982) Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, **37**, 77-81.
- Kuil, C.W. and Mulder, E. (1996) Deoxyribonucleic acid-binding ability of androgen receptors in whole cells: implications for the actions of androgens and antiandrogens. *Endocrinology*, **137**, 1870-1877.
- Kung, A.L., Rebel, V.I., Bronson, R.T., Ch'ng, L.E., Sieff, C.A., Livingston, D.M. and Yao, T.P. (2000) Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev*, **14**, 272-277.
- Kuo, M.L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (2004) N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev*, **18**, 1862-1874.
- Kyprianou, N. and Isaacs, J.T. (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology*, **122**, 552-562.
- La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E. and Fischbeck, K.H. (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, **352**, 77-79.
- Labrie, C., Belanger, A. and Labrie, F. (1988) Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology*, **123**, 1412-1417.
- Labrie, F. (1991) Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol*, **78**, C113-118.
- Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C. and Simard, J. (2001) DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol*, **22**, 185-212.
- Lahn, M., Sundell, K., Gleave, M., Ladan, F., Su, C., Li, S., Ma, D., Paterson, B.M. and Bumol, T.F. (2004) Protein kinase C- $\alpha$  in prostate cancer. *BJU Int*, **93**, 1076-1081.
- Lange, E.M., Ho, L.A., Beebe-Dimmer, J.L., Wang, Y., Gillanders, E.M., Trent, J.M., Lange, L.A., Wood, D.P. and Cooney, K.A. (2006) Genome-wide linkage scan for prostate cancer susceptibility genes in men with aggressive disease: significant evidence for linkage at chromosome 15q12. *Hum Genet*, **119**, 400-407.
- Langley, E., Zhou, Z.X. and Wilson, E.M. (1995) Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *J Biol Chem*, **270**, 29983-29990.
- Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, **19**, 207-226.



- Laurent, B.C., Treich, I. and Carlson, M. (1993) The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev*, **7**, 583-591.
- Lee, D.K. and Chang, C. (2003a) Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **84**, 41-49.
- Lee, D.K., Duan, H.O. and Chang, C. (2000a) From androgen receptor to the general transcription factor TFIIH. Identification of cdk activating kinase (CAK) as an androgen receptor NH(2)-terminal associated coactivator. *J Biol Chem*, **275**, 9308-9313.
- Lee, D.Y., Northrop, J.P., Kuo, M.H. and Stallcup, M.R. (2006) Histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a is a transcriptional coactivator for nuclear receptors. *J Biol Chem*, **281**, 8476-8485.
- Lee, H.J. and Chang, C. (2003b) Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 1613-1622.
- Lee, M.M., Wang, R.T., Hsing, A.W., Gu, F.L., Wang, T. and Spitz, M. (1998a) Case-control study of diet and prostate cancer in China. *Cancer Causes Control*, **9**, 545-552.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Na, S.Y., Kim, T.S., Choi, H.S., Im, S.Y. and Lee, J.W. (1998b) Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*, **273**, 16651-16654.
- Lee, S.O., Lou, W., Hou, M., de Miguel, F., Gerber, L. and Gao, A.C. (2003a) Interleukin-6 promotes androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*, **9**, 370-376.
- Lee, S.O., Lou, W., Hou, M., Onate, S.A. and Gao, A.C. (2003b) Interleukin-4 enhances prostate-specific antigen expression by activation of the androgen receptor and Akt pathway. *Oncogene*, **22**, 7981-7988.
- Lee, Y.H., Koh, S.S., Zhang, X., Cheng, X. and Stallcup, M.R. (2002) Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*, **22**, 3621-3632.
- Lee, Y.K., Dell, H., Dowhan, D.H., Hadzopoulou-Cladaras, M. and Moore, D.D. (2000b) The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol Cell Biol*, **20**, 187-195.
- Leist, M. and Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 589-598.
- Leo, C. and Chen, J.D. (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*, **245**, 1-11.
- LeRoith, D. and Roberts, C.T., Jr. (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*, **195**, 127-137.
- Leung, P.C. and Steele, G.L. (1992) Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev*, **13**, 476-498.
- Li, J., Fu, J., Toumazou, C., Yoon, H.G. and Wong, J. (2006) A role of the amino-terminal (N) and carboxyl-terminal (C) interaction in binding of androgen receptor to chromatin. *Mol Endocrinol*, **20**, 776-785.
- Li, J., O'Malley, B.W. and Wong, J. (2000) p300 requires its histone acetyltransferase activity and SRC-1 interaction domain to facilitate thyroid hormone receptor activation in chromatin. *Mol Cell Biol*, **20**, 2031-2042.
- Li, X., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol*, **23**, 3763-3773.



- Liao, D.J. and Dickson, R.B. (2000) c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **7**, 143-164.
- Liao, G., Chen, L.Y., Zhang, A., Godavarthy, A., Xia, F., Ghosh, J.C., Li, H. and Chen, J.D. (2003) Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem*, **278**, 5052-5061.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, **343**, 78-85.
- Lim, C.S., Baumann, C.T., Htun, H., Xian, W., Irie, M., Smith, C.L. and Hager, G.L. (1999) Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol Endocrinol*, **13**, 366-375.
- Lin, D.Y., Fang, H.I., Ma, A.H., Huang, Y.S., Pu, Y.S., Jenster, G., Kung, H.J. and Shih, H.M. (2004a) Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx. *Mol Cell Biol*, **24**, 10529-10541.
- Lin, H.K., Hu, Y.C., Lee, D.K. and Chang, C. (2004b) Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol*, **18**, 2409-2423.
- Lin, H.K., Wang, L., Hu, Y.C., Altuwaijri, S. and Chang, C. (2002) Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *Embo J*, **21**, 4037-4048.
- Lin, H.K., Yeh, S., Kang, H.Y. and Chang, C. (2001) Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7200-7205.
- Link, K.A., Burd, C.J., Williams, E., Marshall, T., Rosson, G., Henry, E., Weissman, B. and Knudsen, K.E. (2005) BAF57 governs androgen receptor action and androgen-dependent proliferation through SWI/SNF. *Mol Cell Biol*, **25**, 2200-2215.
- Lopez-Rodas, G., Brosch, G., Georgieva, E.I., Sendra, R., Franco, L. and Loidl, P. (1993) Histone deacetylase. A key enzyme for the binding of regulatory proteins to chromatin. *FEBS Lett*, **317**, 175-180.
- Losel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H.C., Rossol-Haseroth, K. and Wehling, M. (2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*, **83**, 965-1016.
- Loven, M.A., Muster, N., Yates, J.R. and Nardulli, A.M. (2003) A novel estrogen receptor alpha-associated protein, template-activating factor Ibeta, inhibits acetylation and transactivation. *Mol Endocrinol*, **17**, 67-78.
- Loy, C.J., Sim, K.S. and Yong, E.L. (2003) Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4562-4567.
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sar, M., Tan, J., Higgs, H.N., Larson, R.E., French, F.S. and Wilson, E.M. (1988) The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol*, **2**, 1265-1275.
- Lunn, R.M., Bell, D.A., Mohler, J.L. and Taylor, J.A. (1999) Prostate cancer risk and polymorphism in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2). *Carcinogenesis*, **20**, 1727-1731.
- Lyng, F.M., Jones, G.R. and Rommerts, F.F. (2000) Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic



- responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol Reprod*, **63**, 736-747.
- Mackay, H.J. and Twelves, C.J. (2003) Protein kinase C: a target for anticancer drugs? *Endocr Relat Cancer*, **10**, 389-396.
- MacLean, H.E., Choi, W.T., Rekaris, G., Warne, G.L. and Zajac, J.D. (1995) Abnormal androgen receptor binding affinity in subjects with Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy). *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 508-516.
- Mai, R.T., Yeh, T.S., Kao, C.F., Sun, S.K., Huang, H.H. and Wu Lee, Y.H. (2006) Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression. *Oncogene*, **25**, 448-462.
- Maiguel, D.A., Jones, L., Chakravarty, D., Yang, C. and Carrier, F. (2004) Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol*, **24**, 3703-3711.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J. and Shan, B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, **284**, 1362-1365.
- Manin, M., Baron, S., Goossens, K., Beaudoin, C., Jean, C., Veyssiere, G., Verhoeven, G. and Morel, L. (2002) Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J*, **366**, 729-736.
- Manin, M., Veyssiere, G., Cheyvalier, D., Chevalier, M., Lecher, P. and Jean, C. (1992) *In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens*.
- Manolagas, S.C., Kousteni, S. and Jilka, R.L. (2002) Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res*, **57**, 385-409.
- Marcell, T.J., Harman, S.M., Urban, R.J., Metz, D.D., Rodgers, B.D. and Blackman, M.R. (2001) Comparison of GH, IGF-I, and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**, E1159-1164.
- Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., Zhao, Y., DiConcini, D., Puxeddu, E., Esen, A., Eastham, J., Weigel, N.L. and Lamb, D.J. (2000) Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res*, **60**, 944-949.
- Mariano, A.R., Colombo, E., Luzi, L., Martinelli, P., Volorio, S., Bernard, L., Meani, N., Bergomas, R., Alcalay, M. and Pelicci, P.G. (2006) Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene*, **25**, 4376-4380.
- Mark, M., Yoshida-Komiya, H., Gehin, M., Liao, L., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., Chambon, P. and Xu, J. (2004) Partially redundant functions of SRC-1 and TIF2 in postnatal survival and male reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4453-4458.
- Marshall, T.W., Link, K.A., Petre-Draviam, C.E. and Knudsen, K.E. (2003) Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *J Biol Chem*, **278**, 30605-30613.
- Martel, C., Melner, M.H., Gagne, D., Simard, J. and Labrie, F. (1994) Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol Cell Endocrinol*, **104**, 103-111.
- Martinez, E. (2002) Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol*, **50**, 925-947.





- Masiello, D., Cheng, S., Bubley, G.J., Lu, M.L. and Balk, S.P. (2002) Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J Biol Chem*, **277**, 26321-26326.
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev*, **19**, 2783-2810.
- Matias, P.M., Donner, P., Coelho, R., Thomaz, M., Peixoto, C., Macedo, S., Otto, N., Joschko, S., Scholz, P., Wegg, A., Basler, S., Schafer, M., Egner, U. and Carrondo, M.A. (2000) Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem*, **275**, 26164-26171.
- Matsuda, T., Junicho, A., Yamamoto, T., Kishi, H., Korkmaz, K., Saatcioglu, F., Fuse, H. and Muraguchi, A. (2001) Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 179-187.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Ui, M. and Hanaoka, F. (1993) Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem*, **268**, 10582-10587.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G. and Fischbeck, K.H. (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*, **9**, 2197-2202.
- McCarty, M.F. (2004) Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy. *Integr Cancer Ther*, **3**, 349-380.
- McElreavey, K. and Fellous, M. (1999) Sex determination and the Y chromosome. *Am J Med Genet*, **89**, 176-185.
- McEwan, I.J. (2001) Structural and functional alterations in the androgen receptor in spinal bulbar muscular atrophy. *Biochem Soc Trans*, **29**, 222-227.
- McEwan, I.J. and Gustafsson, J. (1997) Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8485-8490.
- McFarland, K.C., Sprengel, R., Phillips, H.S., Kohler, M., Rosemblyt, N., Nikolics, K., Segaloff, D.L. and Seeburg, P.H. (1989) Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*, **245**, 494-499.
- McMahon, C., Suthiphongchai, T., DiRenzo, J. and Ewen, M.E. (1999) P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5382-5387.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. and Cyr, D.M. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol*, **3**, 100-105.
- Mendis-Handagama, S.M. and Ariyaratne, H.B. (2004) Effects of thyroid hormones on Leydig cells in the postnatal testis. *Histol Histopathol*, **19**, 985-997.
- Merry, D.E. (2005) Animal models of Kennedy disease. *NeuroRx*, **2**, 471-479.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. and Gannon, F. (2003) Estrogen receptor- $\alpha$  directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, **115**, 751-763.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Gunther, T., Buettner, R. and Schule, R. (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, **437**, 436-439.
- Mhatre, A.N., Trifiro, M.A., Kaufman, M., Kazemi-Esfarjani, P., Figlewicz, D., Rouleau, G. and Pinsky, L. (1993) Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet*, **5**, 184-188.



- Michel, G. and Baulieu, E.E. (1980) Androgen receptor in rat skeletal muscle: characterization and physiological variations. *Endocrinology*, **107**, 2088-2098.
- Miller, R.W. and Rubinstein, J.H. (1995) Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*, **56**, 112-115.
- Miyake, H., Pollak, M. and Gleave, M.E. (2000) Castration-induced up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 potentiates insulin-like growth factor-I activity and accelerates progression to androgen independence in prostate cancer models. *Cancer Res*, **60**, 3058-3064.
- Miyamoto, H., Yeh, S., Lardy, H., Messing, E. and Chang, C. (1998) Delta5-androstenediol is a natural hormone with androgenic activity in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11083-11088.
- Mohrmann, L. and Verrijzer, C.P. (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta*, **1681**, 59-73.
- Monder, C., Hardy, M.P., Blanchard, R.J. and Blanchard, D.C. (1994) Comparative aspects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: development of a model for the mediation of Leydig cell function by corticosteroids. *Steroids*, **59**, 69-73.
- Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.L. and Look, A.T. (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, **263**, 1281-1284.
- Muir, C.S., Nectoux, J. and Staszewski, J. (1991) The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol*, **30**, 133-140.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep*, **2**, 1133-1138.
- Na, S.Y., Lee, S.K., Han, S.J., Choi, H.S., Im, S.Y. and Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*, **273**, 10831-10834.
- Nagabhushan, M., Miller, C.M., Pretlow, T.P., Giaconia, J.M., Edgehouse, N.L., Schwartz, S., Kung, H.J., de Vere White, R.W., Gumerlock, P.H., Resnick, M.I., Amini, S.B. and Pretlow, T.G. (1996) CWR22: the first human prostate cancer xenograft with strongly androgen-dependent and relapsed strains both in vivo and in soft agar. *Cancer Res*, **56**, 3042-3046.
- Nagy, L. and Freeman, D.A. (1990) Effect of cholesterol transport inhibitors on steroidogenesis and plasma membrane cholesterol transport in cultured MA-10 Leydig tumor cells. *Endocrinology*, **126**, 2267-2276.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L. and Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, **89**, 373-380.
- Nam, R.K., Toi, A., Vesprini, D., Ho, M., Chu, W., Harvie, S., Sweet, J., Trachtenberg, J., Jewett, M.A. and Narod, S.A. (2001) V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology*, **57**, 199-204.
- Navone, N.M., Troncoso, P., Pisters, L.L., Goodrow, T.L., Palmer, J.L., Nichols, W.W., von Eschenbach, A.C. and Conti, C.J. (1993) p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 1657-1669.
- Nazareth, L.V. and Weigel, N.L. (1996) Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem*, **271**, 19900-19907.



- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M. (1992) Association of the 90-kDa heat shock protein does not affect the ligand-binding ability of androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **42**, 803-812.
- Nickerson, T., Chang, F., Lorimer, D., Smeekens, S.P., Sawyers, C.L. and Pollak, M. (2001) In vivo progression of LAPC-9 and LNCaP prostate cancer models to androgen independence is associated with increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR). *Cancer Res*, **61**, 6276-6280.
- Nishio, H. and Walsh, M.J. (2004) CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11257-11262.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K. and Milburn, M.V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, **395**, 137-143.
- Nozawa, Y., Van Belzen, N., Van der Made, A.C., Dinjens, W.N. and Bosman, F.T. (1996) Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol*, **178**, 48-52.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.
- Okamoto, M., Lee, C. and Oyasu, R. (1997) Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*, **57**, 141-146.
- Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E. and Fukasawa, K. (2000) Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, **103**, 127-140.
- Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M. and Nagata, K. (2001) Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett*, **506**, 272-276.
- Okuwaki, M. and Nagata, K. (1998) Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J Biol Chem*, **273**, 34511-34518.
- Olson, M.O., Wallace, M.O., Herrera, A.H., Marshall-Carlson, L. and Hunt, R.C. (1986) Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry*, **25**, 484-491.
- Ordentlich, P., Downes, M. and Evans, R.M. (2001) Corepressors and nuclear hormone receptor function. *Curr Top Microbiol Immunol*, **254**, 101-116.
- Ortlund, E.A., Lee, Y., Solomon, I.H., Hager, J.M., Safi, R., Choi, Y., Guan, Z., Tripathy, A., Raetz, C.R., McDonnell, D.P., Moore, D.D. and Redinbo, M.R. (2005) Modulation of human nuclear receptor LHR-1 activity by phospholipids and SHP. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 357-363.
- Orwoll, E.S. and Klein, R.F. (1995) Osteoporosis in men. *Endocr Rev*, **16**, 87-116.
- Osaki, M., Oshimura, M. and Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 667-676.
- Ourlin, J.C., Lasserre, F., Pineau, T., Fabre, J.M., Sa-Cunha, A., Maurel, P., Vilarem, M.J. and Pascussi, J.M. (2003) The small heterodimer partner interacts with the pregnane X receptor and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*, **17**, 1693-1703.
- Oz, O.K., Hirasawa, G., Lawson, J., Nanu, L., Constantinescu, A., Antich, P.P., Mason, R.P., Tsyganov, E., Parkey, R.W., Zerwekh, J.E. and Simpson, E.R. (2001) Bone phenotype of the aromatase deficient mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 49-59.



- Ozanne, D.M., Brady, M.E., Cook, S., Gaughan, L., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2000) Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol*, **14**, 1618-1626.
- Palmberg, C., Koivisto, P., Hyytinen, E., Isola, J., Visakorpi, T., Kallioniemi, O.P. and Tammela, T. (1997) Androgen receptor gene amplification in a recurrent prostate cancer after monotherapy with the nonsteroidal potent antiandrogen Casodex (bicalutamide) with a subsequent favorable response to maximal androgen blockade. *Eur Urol*, **31**, 216-219.
- Pang, Q., Christianson, T.A., Koretsky, T., Carlson, H., David, L., Keeble, W., Faulkner, G.R., Speckhart, A. and Bagby, G.C. (2003) Nucleophosmin interacts with and inhibits the catalytic function of eukaryotic initiation factor 2 kinase PKR. *J Biol Chem*, **278**, 41709-41717.
- Park, J.I., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2003) Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med*, **52**, 174-181.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E. and Mangelsdorf, D.J. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, **93**, 693-704.
- Peterson, C.L. and Herskowitz, I. (1992) Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell*, **68**, 573-583.
- Peterziel, H., Mink, S., Schonert, A., Becker, M., Klocker, H. and Cato, A.C. (1999) Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene*, **18**, 6322-6329.
- Petre, C.E., Wetherill, Y.B., Danielsen, M. and Knudsen, K.E. (2002) Cyclin D1: mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity. *J Biol Chem*, **277**, 2207-2215.
- Petrij, F., Giles, R.H., Dauwerse, H.G., Saris, J.J., Hennekam, R.C., Masuno, M., Tommerup, N., van Ommen, G.J., Goodman, R.H., Peters, D.J. and et al. (1995) Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, **376**, 348-351.
- Pfeil, K., Eder, I.E., Putz, T., Ramoner, R., Culig, Z., Ueberall, F., Bartsch, G. and Klocker, H. (2004) Long-term androgen-ablation causes increased resistance to PI3K/Akt pathway inhibition in prostate cancer cells. *Prostate*, **58**, 259-268.
- Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P. and Auwerx, J. (2002) SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*, **111**, 931-941.
- Pisters, L.L., Pettaway, C.A., Troncoso, P., McDonnell, T.J., Stephens, L.C., Wood, C.G., Do, K.A., Brisbay, S.M., Wang, X., Hossan, E.A., Evans, R.B., Soto, C., Jacobson, M.G., Parker, K., Merritt, J.A., Steiner, M.S. and Logothetis, C.J. (2004) Evidence that transfer of functional p53 protein results in increased apoptosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 2587-2593.
- Poletti, A. (2004) The polyglutamine tract of androgen receptor: from functions to dysfunctions in motor neurons. *Front Neuroendocrinol*, **25**, 1-26.
- Poujol, N. and Sultan, C. (2000) Action moléculaire des androgènes et relation structure-fonction du récepteur des androgènes. *Médecine sciences*, **16**, 793-802.
- Powell, C.T., Brittis, N.J., Stec, D., Hug, H., Heston, W.D. and Fair, W.R. (1996) Persistent membrane translocation of protein kinase C alpha during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ*, **7**, 419-428.
- Powell, S.M., Christiaens, V., Voulgaraki, D., Waxman, J., Claessens, F. and Bevan, C.L. (2004) Mechanisms of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate. *Endocr Relat Cancer*, **11**, 117-130.





- Pratt, W.B. (1997) The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **37**, 297-326.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Morishima, Y. and Murphy, P.J. (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*, **40**, 41-58.
- Prescott, J. and Coetzee, G.A. (2006) Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett*, **231**, 12-19.
- Prewett, M., Rockwell, P., Rockwell, R.F., Giorgio, N.A., Mendelsohn, J., Scher, H.I. and Goldstein, N.I. (1996) The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, **19**, 419-427.
- Privalsky, M.L. (2001) Regulation of SMRT and N-CoR corepressor function. *Curr Top Microbiol Immunol*, **254**, 117-136.
- Privalsky, M.L. (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol*, **66**, 315-360.
- Qiu, Y., Ravi, L. and Kung, H.J. (1998a) Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature*, **393**, 83-85.
- Qiu, Y., Robinson, D., Pretlow, T.G. and Kung, H.J. (1998b) Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3644-3649.
- Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., el-Awady, M.K., Wilson, E.M. and French, F.S. (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*, **16**, 271-321.
- Rassow, J., Voos, W. and Pfanner, N. (1995) Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. *Trends Cell Biol*, **5**, 207-212.
- Raynaud, J.P., Bonne, C., Moguilewsky, M., Lefebvre, F.A., Belanger, A. and Labrie, F. (1984) The pure antiandrogen RU 23908 (Anandron), a candidate of choice for the combined antihormonal treatment of prostatic cancer: a review. *Prostate*, **5**, 299-311.
- Redner, R.L., Rush, E.A., Faas, S., Rudert, W.A. and Corey, S.J. (1996) The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*, **87**, 882-886.
- Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, **378**, 681-689.
- Reutens, A.T., Fu, M., Wang, C., Albanese, C., McPhaul, M.J., Sun, Z., Balk, S.P., Janne, O.A., Palvimo, J.J. and Pestell, R.G. (2001) Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol Endocrinol*, **15**, 797-811.
- Roche, P.J., Hoare, S.A. and Parker, M.G. (1992) A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **6**, 2229-2235.
- Rochette-Egly, C. (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal*, **15**, 355-366.
- Roeder, R.G. (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett*, **579**, 909-915.
- Roopra, A., Qazi, R., Schoenike, B., Daley, T.J. and Morrison, J.F. (2004) Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell*, **14**, 727-738.
- Rosner, W. (1991) Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **20**, 697-720.



- Ross, J.S., Kallakury, B.V., Sheehan, C.E., Fisher, H.A., Kaufman, R.P., Jr., Kaur, P., Gray, K. and Stringer, B. (2004) Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res*, **10**, 2466-2472.
- Rouleau, N., Domans'kyi, A., Reeben, M., Moilanen, A.M., Havas, K., Kang, Z., Owen-Hughes, T., Palvimo, J.J. and Janne, O.A. (2002) Novel ATPase of SNF2-like protein family interacts with androgen receptor and modulates androgen-dependent transcription. *Mol Biol Cell*, **13**, 2106-2119.
- Ruggero, D. and Pandolfi, P.P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*, **3**, 179-192.
- Russell, P.J., Bennett, S. and Stricker, P. (1998) Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem*, **44**, 705-723.
- Saartok, T., Dahlberg, E. and Gustafsson, J.A. (1984) Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. *Endocrinology*, **114**, 2100-2106.
- Sadar, M.D. (1999) Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via cross-talk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways. *J Biol Chem*, **274**, 7777-7783.
- Saez, J.M. (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev*, **15**, 574-626.
- Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Brogna, C., Piccirilli, M., D'Andrea, G., Occhiogrosso, G., Pichierri, A. and Caroli, E. (2005) Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. *J Exp Clin Cancer Res*, **24**, 203-207.
- Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P. and Kato, S. (2004) Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1673-1678.
- Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H. and Kato, S. (2003) Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 167-171.
- Savkur, R.S. and Olson, M.O. (1998) Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4508-4515.
- Schaid, D.J. (2004) The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet*, **13 Spec No 1**, R103-121.
- Scher, H.I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J. and Cordon-Cardo, C. (1995) Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res*, **1**, 545-550.
- Scherr, D.S., Vaughan, E.D., Jr., Wei, J., Chung, M., Felsen, D., Allbright, R. and Knudsen, B.S. (1999) BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol*, **162**, 12-16; discussion 16-17.
- Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D. and Nakatani, Y. (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem*, **274**, 1189-1192.
- Schimmer, A.D. (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*, **64**, 7183-7190.
- Schmidt-Zachmann, M.S., Hugle-Dorr, B. and Franke, W.W. (1987) A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *Embo J*, **6**, 1881-1890.



- Schoenmakers, E., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W. and Claessens, F. (2000) Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem*, **275**, 12290-12297.
- Schurter, B.T., Koh, S.S., Chen, D., Bunick, G.J., Harp, J.M., Hanson, B.L., Henschen-Edman, A., Mackay, D.R., Stallcup, M.R. and Aswad, D.W. (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry*, **40**, 5747-5756.
- Segnitz, B. and Gehring, U. (1997) The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem*, **272**, 18694-18701.
- Seo, S.B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W.S. and Chakravarti, D. (2001) Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell*, **104**, 119-130.
- Seol, W., Choi, H.S. and Moore, D.D. (1996) An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science*, **272**, 1336-1339.
- Shang, Y., Myers, M. and Brown, M. (2002) Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell*, **9**, 601-610.
- Shao, W. and Brown, M. (2004) Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*, **6**, 39-52.
- Shatkina, L., Mink, S., Rogatsch, H., Klocker, H., Langer, G., Nestl, A. and Cato, A.C. (2003) The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol*, **23**, 7189-7197.
- Shenk, J.L., Fisher, C.J., Chen, S.Y., Zhou, X.F., Tillman, K. and Shemshedini, L. (2001) p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol Chem*, **276**, 38472-38479.
- Sheppard, H.M., Harries, J.C., Hussain, S., Bevan, C. and Heery, D.M. (2001) Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1. *Mol Cell Biol*, **21**, 39-50.
- Shi, Y., Brands, F.H., Chatterjee, S., Feng, A.C., Groshen, S., Schewe, J., Lieskovsky, G. and Cote, R.J. (2001) Her-2/neu expression in prostate cancer: high level of expression associated with exposure to hormone therapy and androgen independent disease. *J Urol*, **166**, 1514-1519.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. and Greene, G.L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927-937.
- Shields, L.B., Gercel-Taylor, C., Yashar, C.M., Wan, T.C., Katsanis, W.A., Spinnato, J.A. and Taylor, D.D. (1997) Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. *J Soc Gynecol Investig*, **4**, 298-304.
- Shukla, S. and Gupta, S. (2004) Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin Cancer Res*, **10**, 3169-3178.
- Siegsmond, M.J., Yamazaki, H. and Pastan, I. (1994) Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia. *J Urol*, **151**, 1396-1399.
- Signoretti, S., Montironi, R., Manola, J., Altamari, A., Tam, C., Bubley, G., Balk, S., Thomas, G., Kaplan, I., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Kantoff, P. and Loda, M. (2000) Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1918-1925.



- Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S. and Wilson, E.M. (1991) Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem*, **266**, 510-518.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P.N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**, 240-244.
- Singh, R., Artaza, J.N., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F. and Bhasin, S. (2003) Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology*, **144**, 5081-5088.
- Sioud, M. (2005) siRNA delivery in vivo. *Methods Mol Biol*, **309**, 237-249.
- Sitaram, N. and Nagaraj, R. (1995) Seminal plasmin. *Bioessays*, **17**, 415-422.
- Skaar, T.C., Prasad, S.C., Sharareh, S., Lippman, M.E., Brunner, N. and Clarke, R. (1998) Two-dimensional gel electrophoresis analyses identify nucleophosmin as an estrogen regulated protein associated with acquired estrogen-independence in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **67**, 391-402.
- Slamon, D. and Pegram, M. (2001) Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol*, **28**, 13-19.
- Smith, C.L., Nawaz, Z. and O'Malley, B.W. (1997) Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*, **11**, 657-666.
- Song, L.N., Coghlan, M. and Gelmann, E.P. (2004) Antiandrogen effects of mifepristone on coactivator and corepressor interactions with the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **18**, 70-85.
- Sorensen, D.R., Leirdal, M. and Sioud, M. (2003) Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol*, **327**, 761-766.
- Soussi, T., Dehouche, K. and Beroud, C. (2000) p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat*, **15**, 105-113.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194-198.
- Stattin, P., Bylund, A., Rinaldi, S., Biessy, C., Dechaud, H., Stenman, U.H., Egevad, L., Riboli, E., Hallmans, G. and Kaaks, R. (2000) Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1910-1917.
- Steinsapir, J., Socci, R. and Reinach, P. (1991) Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **179**, 90-96.
- Stenoien, D.L., Cummings, C.J., Adams, H.P., Mancini, M.G., Patel, K., DeMartino, G.N., Marcelli, M., Weigel, N.L. and Mancini, M.A. (1999) Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum Mol Genet*, **8**, 731-741.
- Stewart, J.R. and O'Brian, C.A. (2005) Protein kinase C- $\alpha$  mediates epidermal growth factor receptor transactivation in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, **4**, 726-732.
- Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y. and Manna, P.R. (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol*, **19**, 2647-2659.





- Subong, E.N., Shue, M.J., Epstein, J.I., Briggman, J.V., Chan, P.K. and Partin, A.W. (1999) Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate*, **39**, 298-304.
- Suh, J. and Rabson, A.B. (2004) NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem*, **91**, 100-117.
- Sun, C., Shi, Y., Xu, L.L., Nageswararao, C., Davis, L.D., Segawa, T., Dobi, A., McLeod, D.G. and Srivastava, S. (2006) Androgen receptor mutation (T877A) promotes prostate cancer cell growth and cell survival. *Oncogene*.
- Sun, M., Yang, L., Feldman, R.I., Sun, X.M., Bhalla, K.N., Jove, R., Nicosia, S.V. and Cheng, J.Q. (2003) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *J Biol Chem*, **278**, 42992-43000.
- Suzuki, H., Akakura, K., Komiya, A., Aida, S., Akimoto, S. and Shimazaki, J. (1996) Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate*, **29**, 153-158.
- Suzuki, H., Sato, N., Watabe, Y., Masai, M., Seino, S. and Shimazaki, J. (1993) Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **46**, 759-765.
- Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K.K. and Kundu, T.K. (2005) Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol*, **25**, 7534-7545.
- Szebeni, A., Herrera, J.E. and Olson, M.O. (1995) Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry*, **34**, 8037-8042.
- Szebeni, A., Hingorani, K., Negi, S. and Olson, M.O. (2003) Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23. *J Biol Chem*, **278**, 9107-9115.
- Szebeni, A., Mehrotra, B., Baumann, A., Adam, S.A., Wingfield, P.T. and Olson, M.O. (1997) Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry*, **36**, 3941-3949.
- Szebeni, A. and Olson, M.O. (1999) Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*, **8**, 905-912.
- Tan, J., Sharief, Y., Hamil, K.G., Gregory, C.W., Zang, D.Y., Sar, M., Gumerlock, P.H., deVere White, R.W., Pretlow, T.G., Harris, S.E., Wilson, E.M., Mohler, J.L. and French, F.S. (1997) Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol Endocrinol*, **11**, 450-459.
- Tanaka, M., Sasaki, H., Kino, I., Sugimura, T. and Terada, M. (1992) Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res*, **52**, 3372-3377.
- Tanaka, Y., Naruse, I., Maekawa, T., Masuya, H., Shiroishi, T. and Ishii, S. (1997) Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10215-10220.
- Tang, B.L. (2005) Alzheimer's disease: channeling APP to non-amyloidogenic processing. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 375-378.
- Tantivejkul, K., Kalikin, L.M. and Pienta, K.J. (2004) Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J Cell Biochem*, **91**, 706-717.
- Taplin, M.E., Bubley, G.J., Ko, Y.J., Small, E.J., Upton, M., Rajeshkumar, B. and Balk, S.P. (1999) Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res*, **59**, 2511-2515.



- Taplin, M.E., Bubley, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N. and Balk, S.P. (1995) Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*, **332**, 1393-1398.
- Tawfic, S. and Ahmed, K. (1994) Growth stimulus-mediated differential translocation of casein kinase 2 to the nuclear matrix. Evidence based on androgen action in the prostate. *J Biol Chem*, **269**, 24615-24620.
- Tawfic, S., Goueli, S.A., Olson, M.O. and Ahmed, K. (1993) Androgenic regulation of the expression and phosphorylation of prostatic nucleolar protein B23. *Cell Mol Biol Res*, **39**, 43-51.
- Tawfic, S., Olson, M.O. and Ahmed, K. (1995) Role of protein phosphorylation in post-translational regulation of protein B23 during programmed cell death in the prostate gland. *J Biol Chem*, **270**, 21009-21015.
- Thomas, M., Dadgar, N., Aphale, A., Harrell, J.M., Kunkel, R., Pratt, W.B. and Lieberman, A.P. (2004) Androgen receptor acetylation site mutations cause trafficking defects, misfolding, and aggregation similar to expanded glutamine tracts. *J Biol Chem*, **279**, 8389-8395.
- Thomas, M., Harrell, J.M., Morishima, Y., Peng, H.M., Pratt, W.B. and Lieberman, A.P. (2006) Pharmacologic and genetic inhibition of hsp90-dependent trafficking reduces aggregation and promotes degradation of the expanded glutamine androgen receptor without stress protein induction. *Hum Mol Genet*, **15**, 1876-1883.
- Toft, D., Shyamala, G. and Gorski, J. (1967) A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **57**, 1740-1743.
- Tokuyama, Y., Horn, H.F., Kawamura, K., Tarapore, P. and Fukasawa, K. (2001) Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem*, **276**, 21529-21537.
- Trapman, J., Klaassen, P., Kuiper, G.G., van der Korput, J.A., Faber, P.W., van Rooij, H.C., Geurts van Kessel, A., Voorhorst, M.M., Mulder, E. and Brinkmann, A.O. (1988) Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **153**, 241-248.
- Tsui, K.H., Cheng, A.J., Chang, P.L., Pan, T.L. and Yung, B.Y. (2004) Association of nucleophosmin/B23 mRNA expression with clinical outcome in patients with bladder carcinoma. *Urology*, **64**, 839-844.
- Tu, H., Jacobs, S.C., Borkowski, A. and Kyprianou, N. (1996) Incidence of apoptosis and cell proliferation in prostate cancer: relationship with TGF-beta1 and bcl-2 expression. *Int J Cancer*, **69**, 357-363.
- Turkeri, L.N., Sakr, W.A., Wykes, S.M., Grignon, D.J., Pontes, J.E. and Macoska, J.A. (1994) Comparative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression and protein product in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Prostate*, **25**, 199-205.
- Tyagi, R.K., Lavrovsky, Y., Ahn, S.C., Song, C.S., Chatterjee, B. and Roy, A.K. (2000) Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol*, **14**, 1162-1174.
- Ueda, T., Bruchovsky, N. and Sadar, M.D. (2002) Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem*, **277**, 7076-7085.
- Umekawa, H., Sato, K., Takemura, M., Watanabe, Y., Usui, S., Takahashi, T., Yoshida, S., Olson, M.O. and Furuichi, Y. (2001) The carboxyl terminal sequence of nucleolar protein B23.1 is important in its DNA polymerase alpha-stimulatory activity. *J Biochem (Tokyo)*, **130**, 199-205.
- Untergasser, G., Madersbacher, S. and Berger, P. (2005) Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol*, **40**, 121-128.



- Urban, R.J., Bodenbun, Y.H., Gilkison, C., Foxworth, J., Coggan, A.R., Wolfe, R.R. and Ferrando, A. (1995) Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am J Physiol*, **269**, E820-826.
- Val, P., Lefrancois-Martinez, A.M., Veyssiere, G. and Martinez, A. (2003) SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*, **1**, 8.
- van den Beld, A.W., de Jong, F.H., Grobbee, D.E., Pols, H.A. and Lamberts, S.W. (2000) Measures of bioavailable serum testosterone and estradiol and their relationships with muscle strength, bone density, and body composition in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 3276-3282.
- Van Der Eerden, B.C., Van De Ven, J., Lowik, C.W., Wit, J.M. and Karperien, M. (2002) Sex steroid metabolism in the tibial growth plate of the rat. *Endocrinology*, **143**, 4048-4055.
- van Laar, J.H., Bolt-de Vries, J., Voorhorst-Ogink, M.M. and Brinkmann, A.O. (1989) The human androgen receptor is a 110 kDa protein. *Mol Cell Endocrinol*, **63**, 39-44.
- Vanaja, D.K., Mitchell, S.H., Toft, D.O. and Young, C.Y. (2002) Effect of geldanamycin on androgen receptor function and stability. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 55-64.
- Veierod, M.B., Laake, P. and Thelle, D.S. (1997) Dietary fat intake and risk of prostate cancer: a prospective study of 25,708 Norwegian men. *Int J Cancer*, **73**, 634-638.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C.A., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G., Jenster, G., Trapman, J., Brinkmann, A.O. and Mulder, E. (1992) The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **41**, 665-669.
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C.P., McManus, M., Sharp, P.A., Van Parijs, L., Jaenisch, R. and Jacks, T. (2004) Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10380-10385.
- Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinanen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J. and Kallioniemi, O.P. (1995) In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*, **9**, 401-406.
- Vlietstra, R.J., van Alewijk, D.C., Hermans, K.G., van Steenbrugge, G.J. and Trapman, J. (1998) Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res*, **58**, 2720-2723.
- Vo, N. and Goodman, R.H. (2001) CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **276**, 13505-13508.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J*, **17**, 507-519.
- Wainstein, M.A., He, F., Robinson, D., Kung, H.J., Schwartz, S., Giaconia, J.M., Edgehouse, N.L., Pretlow, T.P., Bodner, D.R., Kursh, E.D. and et al. (1994) CWR22: androgen-dependent xenograft model derived from a primary human prostatic carcinoma. *Cancer Res*, **54**, 6049-6052.
- Waller, A.S., Sharrard, R.M., Berthon, P. and Maitland, N.J. (2000) Androgen receptor localisation and turnover in human prostate epithelium treated with the antiandrogen, casodex. *J Mol Endocrinol*, **24**, 339-351.
- Walsh, F.S. and Celeste, A.J. (2005) Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1513-1517.



- Wang, D., Baumann, A., Szebeni, A. and Olson, M.O. (1994) The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J Biol Chem*, **269**, 30994-30998.
- Wang, L., Lin, H.K., Hu, Y.C., Xie, S., Yang, L. and Chang, C. (2004) Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells. *J Biol Chem*, **279**, 32444-32452.
- Wang, L.G., Liu, X.M., Kreis, W. and Budman, D.R. (1999) Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **259**, 21-28.
- Wang, Q., Carroll, J.S. and Brown, M. (2005) Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol Cell*, **19**, 631-642.
- Wang, Q., Lu, J. and Yong, E.L. (2001a) Ligand- and coactivator-mediated transactivation function (AF2) of the androgen receptor ligand-binding domain is inhibited by the cognate hinge region. *J Biol Chem*, **276**, 7493-7499.
- Wang, Q., Sharma, D., Ren, Y. and Fondell, J.D. (2002) A coregulatory role for the TRAP-mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem*, **277**, 42852-42858.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., Liu, X. and Wu, H. (2003) Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell*, **4**, 209-221.
- Wang, Z., Rose, D.W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., Szeto, D., Gleiberman, A., Krones, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13549-13554.
- Wang, Z.J., Jeffs, B., Ito, M., Achermann, J.C., Yu, R.N., Hales, D.B. and Jameson, J.L. (2001b) Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7988-7993.
- Weber, P., Metzger, D. and Chambon, P. (2001) Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in the mouse brain. *Eur J Neurosci*, **14**, 1777-1783.
- Wen, Y., Hu, M.C., Makino, K., Spohn, B., Bartholomeusz, G., Yan, D.H. and Hung, M.C. (2000) HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res*, **60**, 6841-6845.
- Westin, P., Stattin, P., Damber, J.E. and Bergh, A. (1995) Castration therapy rapidly induces apoptosis in a minority and decreases cell proliferation in a majority of human prostatic tumors. *Am J Pathol*, **146**, 1368-1375.
- Whiting, K.P., Restall, C.J. and Brain, P.F. (2000) Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci*, **67**, 743-757.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A. and Mangelsdorf, D.J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev*, **9**, 1033-1045.
- Wilson, C.M. and McPhaul, M.J. (1994) A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1234-1238.
- Wilson, J.D., Harrod, M.J., Goldstein, J.L., Hemsell, D.L. and MacDonald, P.C. (1974) Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 1. Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestations in a family with the Reifenstein syndrome. *N Engl J Med*, **290**, 1097-1103.





- Windahl, S.H., Andersson, G. and Gustafsson, J.A. (2002) Elucidation of estrogen receptor function in bone with the use of mouse models. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 195-200.
- Wise, G.J., Marella, V.K., Talluri, G. and Shirazian, D. (2000) Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. *J Urol*, **164**, 722-725.
- Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L. and Sobin, L.H. (2002) TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*, **94**, 2511-2516.
- Wu, M.H., Chang, J.H. and Yung, B.Y. (2002) Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis*, **23**, 93-100.
- Xu, J. and Li, Q. (2003) Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol*, **17**, 1681-1692.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C. and O'Malley, B.W. (2000) The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6379-6384.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1998) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, **279**, 1922-1925.
- Xu, W., Cho, H., Kadam, S., Banayo, E.M., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, Emerson, B.M. and Evans, R.M. (2004) A methylation-mediator complex in hormone signaling. *Genes Dev*, **18**, 144-156.
- Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K. and Nakanishi, M. (2000) Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J Cell Biol*, **150**, 873-880.
- Yanase, T., Suzuki, S., Goto, K., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R. and Nawata, H. (2003) Aromatase in bone: roles of Vitamin D3 and androgens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **86**, 393-397.
- Yang, X.J. and Gregoire, S. (2005) Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol*, **25**, 2873-2884.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-324.
- Yang, Y., Chisholm, G.D. and Habib, F.K. (1993) Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha concentrations in BPH and cancer of the prostate: their relationships with tissue androgen levels. *Br J Cancer*, **67**, 152-155.
- Yano, J., Hirabayashi, K., Nakagawa, S., Yamaguchi, T., Nogawa, M., Kashimori, I., Naito, H., Kitagawa, H., Ishiyama, K., Ohgi, T. and Irimura, T. (2004) Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 7721-7726.
- Yao, T.P., Oh, S.P., Fuchs, M., Zhou, N.D., Ch'ng, L.E., Newsome, D., Bronson, R.T., Li, E., Livingston, D.M. and Eckner, R. (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*, **93**, 361-372.
- Ye, K. (2005) Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther*, **4**, 918-923.
- Yeh, S., Lin, H.K., Kang, H.Y., Thin, T.H., Lin, M.F. and Chang, C. (1999) From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5458-5463.



- Yeh, S., Miyamoto, H., Nishimura, K., Kang, H., Ludlow, J., Hsiao, P., Wang, C., Su, C. and Chang, C. (1998) Retinoblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 361-367.
- Yeh, S., Tsai, M.Y., Xu, Q., Mu, X.M., Lardy, H., Huang, K.E., Lin, H., Yeh, S.D., Altuwaijri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B.F., Hung, M.C., Zhang, S., Gan, L. and Chang, C. (2002) Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13498-13503.
- Yong, E.L., Ng, S.C., Roy, A.C., Yun, G. and Ratnam, S.S. (1994) Pregnancy after hormonal correction of severe spermatogenic defect due to mutation in androgen receptor gene. *Lancet*, **344**, 826-827.
- Yoon, H.G. and Wong, J. (2006) The corepressors silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor and nuclear receptor corepressor are involved in agonist- and antagonist-regulated transcription by androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **20**, 1048-1060.
- Yu, R.N., Ito, M., Saunders, T.L., Camper, S.A. and Jameson, J.L. (1998) Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet*, **20**, 353-357.
- Yu, Y., Maggi, L.B., Jr., Brady, S.N., Apicelli, A.J., Dai, M.S., Lu, H. and Weber, J.D. (2006) Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol*, **26**, 3798-3809.
- Yuan, X.J. and Whang, Y.E. (2002) PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene*, **21**, 319-327.
- Yun, J.P., Chew, E.C., Liew, C.T., Chan, J.Y., Jin, M.L., Ding, M.X., Fai, Y.H., Li, H.K., Liang, X.M. and Wu, Q.L. (2003) Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem*, **90**, 1140-1148.
- Yung, B.Y., Busch, H. and Chan, P.K. (1985) Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *Biochim Biophys Acta*, **826**, 167-173.
- Zeller, K.I., Haggerty, T.J., Barrett, J.F., Guo, Q., Wonsey, D.R. and Dang, C.V. (2001) Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. *J Biol Chem*, **276**, 48285-48291.
- Zeng, Y., Opeskin, K., Horvath, L.G., Sutherland, R.L. and Williams, E.D. (2005) Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate*, **65**, 222-230.
- Zhang, H., Thomsen, J.S., Johansson, L., Gustafsson, J.A. and Treuter, E. (2000a) DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem*, **275**, 39855-39859.
- Zhang, J., Thomas, T.Z., Kasper, S. and Matusik, R.J. (2000b) A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. *Endocrinology*, **141**, 4698-4710.
- Zhang, Y., Yang, Y., Yeh, S. and Chang, C. (2004) ARA67/PAT1 functions as a repressor to suppress androgen receptor transactivation. *Mol Cell Biol*, **24**, 1044-1057.
- Zhao, X.Y., Malloy, P.J., Krishnan, A.V., Swami, S., Navone, N.M., Peehl, D.M. and Feldman, D. (2000) Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med*, **6**, 703-706.
- Zheng, P., Eastman, J., Vande Pol, S. and Pimplikar, S.W. (1998) PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14745-14750.



- Zhou, H.J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S.H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2005) SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res*, **65**, 7976-7983.
- Zhou, Z.X., Kemppainen, J.A. and Wilson, E.M. (1995) Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **9**, 605-615.
- Zhou, Z.X., Sar, M., Simental, J.A., Lane, M.V. and Wilson, E.M. (1994) A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem*, **269**, 13115-13123.
- Zilliagus, J., Wright, A.P., Carlstedt-Duke, J., Nilsson, L. and Gustafsson, J.A. (1995) Modulation of DNA-binding specificity within the nuclear receptor family by substitutions at a single amino acid position. *Proteins*, **21**, 57-67.











Les androgènes sont des hormones mâles largement impliquées dans le développement et le maintien des fonctions de leurs organes cibles. L'intégration du signal androgénique est à l'origine du contrôle de différents processus cellulaires tels que la survie, l'apoptose, la prolifération ou encore la différenciation. L'action de ces hormones est relayée au niveau de la cellule par le récepteur des androgènes (AR), un facteur de transcription inductible de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le mode classique d'activation du récepteur des androgènes passe par la fixation de son ligand, sa translocation nucléaire et l'activation de la transcription de gènes cibles. L'activité du récepteur des androgènes est hautement régulée par son interaction avec des partenaires protéiques. Ces co-régulateurs peuvent agir à différents niveaux pour moduler la stabilité du récepteur, son accès au compartiment nucléaire ou encore sa capacité à initier la transcription de ses gènes cibles en réorganisant la structure chromatinienne. Ainsi, les partenaires protéiques du récepteur des androgènes sont des acteurs clefs du contrôle de la physiologie des organes androgéno-dépendants. De plus, une dérégulation des équilibres établis entre ces différentes protéines peut participer aux processus cellulaires qui conduisent à la pathologie et notamment au développement de tumeurs.

Dans l'objectif d'identifier des partenaires du récepteur des androgènes impliqués dans les processus fondamentaux de prolifération et de différenciation, nous avons réalisé un crible différentiel basé sur une chromatographie d'affinité impliquant le récepteur des androgènes contre des extraits de cellules épithéliales androgéno-sensibles dans chacun des deux états cellulaires. Ce crible nous a permis d'identifier la nucléophosmine/B23.1 (NPM) comme un nouveau partenaire du récepteur des androgènes. Cette protéine est fortement accumulée dans les tissus androgéno-dépendants et notamment au niveau de la prostate et interagit préférentiellement avec AR dans des cellules en état de prolifération. Dans la suite de notre travail, nous nous sommes attachés à étudier l'interaction fonctionnelle de la nucléophosmine et du récepteur des androgènes dans le contexte de la pathologie tumorale prostatique. L'analyse de biopsies de cancer de la prostate met en évidence la surexpression de la nucléophosmine dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain. Dans des cellules tumorales prostatiques, NPM et AR sont co-exprimées au niveau nucléaire et interagissent indépendamment de la présence d'hormone. Cette interaction mobilise plusieurs domaines de chacune des deux protéines. De plus, nous avons montré que la nucléophosmine contrôle le niveau d'accumulation de AR et la transcription dépendante des androgènes dans des cellules prostatiques cancéreuses. Plusieurs arguments laissent suggérer qu'elle régule l'activité du récepteur des androgènes en participant à son recrutement sur l'ADN. Ainsi, la dérégulation de l'expression de la nucléophosmine dans les cellules tumorales de la prostate pourrait être à l'origine d'une expression et d'une activité altérées du récepteur des androgènes, et participer à la tumorigenèse prostatique.

Les androgènes sont largement impliqués dans le développement et le maintien des fonctions de leurs organes cibles en contrôlant les processus de survie, d'apoptose, de prolifération ou encore de différenciation cellulaire. L'action de ces hormones est relayée par le récepteur des androgènes (AR) dont l'activité est hautement régulée par son interaction avec des partenaires protéiques. Dans des cellules épithéliales androgéno-sensibles en prolifération, nous avons identifié la nucléophosmine/B23.1 (NPM) comme un nouveau partenaire du récepteur des androgènes. Nous avons montré que NPM est surexprimée dans le tissu tumoral prostatique par rapport au tissu sain au niveau de biopsies, et qu'elle contrôle le niveau d'accumulation de AR et la transcription dépendante des androgènes dans des cellules prostatiques cancéreuses. Ces arguments suggèrent que NPM pourrait être à l'origine d'une expression et d'une activité altérées de AR, et ainsi participer à la tumorigenèse prostatique.

Androgens are implicated both in the developmental and the functional maturation of their target organs by controlling cell survival, apoptosis, proliferation as well as differentiation processes. Androgen action is supported by the androgen receptor (AR) which activity is finely tuned by its interaction with a set of varied co-factors. In androgen-dependant epithelial proliferative cells, we have identified nucleophosmin (NPM) as a new AR interacting protein, and shown that NPM is over-expressed in prostate tumour biopsies compared to normal tissues. We furthermore demonstrated that NPM controls both AR levels and transcription activities in prostate cancer cells. All these results argue in favour of a major role for NPM in the development of prostate tumorigenesis dependant on AR deregulation.